

**Funktionsanalyse von MotE und FliK,  
zwei neuen Proteinen im Flagellenmotor  
von *Sinorhizobium meliloti***

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III  
-BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN-  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von  
**ELKE EGGENHOFER**  
aus Kelheim

Regensburg, Februar 2005

Promotionsgesuch eingereicht am:	9. Februar 2005
Die Arbeit wurde angeleitet von:	Prof. Dr. Rüdiger Schmitt
Prüfungsausschuß:	
Vorsitzender:	Prof. Dr. Reinhard Wirth
Erstgutachter:	Prof. Dr. Rüdiger Schmitt
Zweitgutachter:	Prof. Dr. Reinhard Sterner
Dritter Prüfer:	Prof. Dr. Stephan Schneuwly

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Material</b>	<b>8</b>
2.1 Bakterien und Plasmide .....	8
2.2 Verwendete Oligonukleotide .....	12
2.3 Chemikalien und Enzyme .....	16
2.4 Nährmedien und Antibiotika .....	18
2.4.1 Medium zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	18
2.4.2 Medium zur Anzucht von <i>S. meliloti</i> .....	18
2.5 Puffer und Lösungen .....	20
2.5.1 Lösungen für Mini- und Midi-Plasmidisolierung .....	20
2.5.2 Lösungen für die DNA-Auftrennung .....	20
2.5.3 Lösungen für die Auftrennung von Proteinen .....	21
2.5.4 Lösungen zum Transfer von Proteinen .....	22
2.5.5 Lösungen für die Proteinreinigung .....	22
2.5.6 Lösungen für die Zellfraktionierung .....	23
2.5.7 Lösungen für Reporter-Gen-Analysen .....	23
<b>3. Methoden</b>	<b>24</b>
3.1 Kultivierung von Bakterien .....	24
3.1.1 Anzucht und Lagerung von <i>E. coli</i> .....	24
3.1.2 Anzucht und Lagerung von <i>S. meliloti</i> .....	24
3.2 Isolierung und Reinigung von Nucleinsäuren .....	25
3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	25
3.2.1.1 Mini-Plasmidisolierung .....	25
3.2.1.2 Midi-Plasmidisolierung .....	25
3.2.2 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese .....	26
3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	26
3.3 Enzymatische Modifizierung von DNA .....	26
3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen .....	26

3.3.2	Alkalische Phosphatase Behandlung .....	26
3.4	DNA-Techniken .....	27
3.4.1	Ligieren von DNA-Fragmenten mit Vektoren.....	27
3.4.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	27
3.5	PCR-Methoden .....	27
3.5.1	PCR aus einer <i>S. meliloti</i> Einzelkolonie .....	28
3.5.2	Herstellung von AS-Austauschmutanten und Einführen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR-Mutagenese ( <i>overlap extension</i> ).....	29
3.6	DNA Sequenzanalysen und Auswertungsverfahren.....	30
3.7	Konjugativer Plasmidtransfer von <i>E. coli</i> nach <i>S. meliloti</i> .....	30
3.8	Reportergen-Analysen ( <i>Miller Assays</i> ).....	31
3.9	Isolierung rekombinanter Proteine.....	32
3.9.1	Das IMPACT-CN-System .....	32
3.9.2	Isolierung von FliM aus <i>inclusion bodies</i> .....	34
3.10	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	35
3.9.1	Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Biorad Protein Assay.....	35
3.9.2	Proteinkonzentrationsbestimmung durch Aminosäure-Analyse .....	35
3.11	Immunchemische Methoden.....	36
3.11.1	Gewinnung von denaturierten Proteinproben .....	36
3.11.2	Affinitätsreinigung von Rohseren.....	36
3.11.3	Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE.....	37
3.11.4	Transfer aufgetrennter Proteine auf Nitrocellulosemembran ( <i>Western blot</i> ).....	37
3.11.5	Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz .....	37
3.11.6	Untersuchung von Proteinwechselwirkungen mittels <i>Affinitäts-Western blot</i> .....	38
3.11.7	<i>In vivo</i> Quantifizierung von <i>S. meliloti</i> Proteinen ( <i>Quantitative Western blots</i> ) .....	38
3.12	Limitierte Proteolyse des FliK-Proteins .....	39
3.13	Analytische Ultrazentrifugation.....	40
3.14	Affinitätschromatographie .....	40
3.15	Aggregationshemmung von MotC .....	41

3.16	Auftrennung von <i>S. meliloti</i> -Zellfragmenten.....	41
3.17	Präparation von <i>S. meliloti</i> -Flagellen .....	42
3.18	Fluoreszenzmikroskopie .....	43
3.19	Elektronenmikroskopie.....	43
3.20	Analyse des Schwärmverhaltens motiler <i>S. meliloti</i> -Zellen.....	43
3.21	Analyse der Schwimmggeschwindigkeit motiler <i>S. meliloti</i> -Zellen .....	43
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
4.1	Die Rolle von MotE im Flagellenmotor von <i>S. meliloti</i> .....	45
4.1.1	Computergestützte Sekundärstrukturanalysen.....	46
4.1.2	Nachweis der periplasmatischen Lokalisierung von MotE .....	47
4.1.3	Expression und Stabilität von Motor- und Flagellenproteinen im <i>motE</i> -Deletionsstamm.....	48
4.1.4	Expression und Stabilität von MotE in einer $\Delta$ <i>motC</i> -Mutante .....	50
4.1.5	Quantifizierung der MotC-Reduktion in einer $\Delta$ <i>motE</i> -Mutante .....	51
4.1.6	Messung der <i>motC</i> -Transkription .....	51
4.1.7	Wechselwirkung von MotE und MotC .....	52
4.1.8	Intrazelluläre Stöchiometrie von MotC und MotE .....	53
4.1.9	Aggregationshemmung von MotC.....	55
4.1.10	MotE-Dimerisierung.....	56
4.1.10.1	Chromatographischer Nachweis der Dimerbildung .....	56
4.1.10.2	Stabilisierung des MotE-Dimers durch eine Cysteinbrücke... 57	
4.1.10.3	Charakterisierung des MotE C53A-Mutantenproteins .....	59
4.1.10.4	Warum ist MotE nur als Dimeres aktiv?.....	60
4.2	MotD ist ein FliK-analoger Regulator der Länge des Flagellenhakens.....	62
4.2.1	Computergestützte Analyse der FliK-Sekundärstruktur.....	62
4.2.2	Limitierte Proteolyse des FliK-Proteins.....	65
4.2.3	Monomer oder Oligomer?.....	66
4.2.4	Lokalisierung von FliK.....	68
4.2.5	Wechselwirkung von FliK mit FliM.....	70
4.2.5.1	Affinitätschromatographie .....	70
4.2.5.2	Affinitäts- <i>Western blot</i> .....	71
4.2.6	Intrazelluläre Stöchiometrie von FliK zu FliM.....	72

4.2.7	Einfluß von <i>fliK</i> - und <i>fliM</i> -Deletion auf Motilität und Flagellensynthese .....	74
4.2.8	Export von Flagellinen im $\Delta$ <i>fliK</i> -Mutante .....	77
4.2.9	Transkription des <i>flaA</i> -Gens in einer $\Delta$ <i>fliK</i> -Mutante .....	78
4.2.10	Export von FliK .....	79
4.2.11	<i>flhB</i> -Suppressormutanten von $\Delta$ <i>fliK</i> -Mutanten.....	80
4.2.11.1	Isolierung von $\Delta$ <i>fliK</i> -Suppressormutanten.....	80
4.2.11.2	Charakterisierung der Suppressormutanten .....	81
4.2.12	Elektronenmikroskopie .....	83
4.2.12.1	$\Delta$ <i>fliK</i> -Mutante .....	83
4.2.12.2	<i>phf</i> -Suppressormutante der $\Delta$ <i>fliK</i> -Mutante .....	85
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
5.1	MotE ist ein spezifisches, periplasmatisches Chaperon für MotC .....	88
5.2	FliK bestimmt die Länge des Flagellenhakens .....	91
5.3	Ausblick .....	96
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>Anhang</b>		<b>110</b>

# Abkürzungen

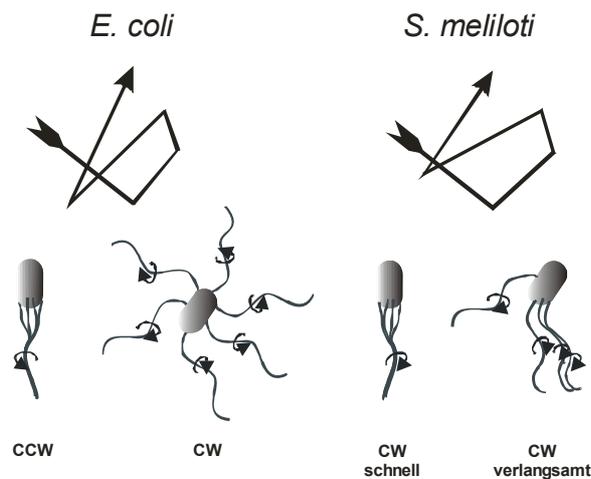
Amp	Ampicillin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
ccw	<i>counterclockwise</i>
cw	<i>clockwise</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ERG	Eppendorf-Reaktionsgefäß
EtOH	Ethanol
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
Kan <sup>R</sup>	Kanamycinresistenz
β-ME	β-Mercaptoethanol
Neo	Neomycin
Neo <sup>R</sup>	Neomycinresistenz
NP-40	Nonidet-P40
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (Natrium-Dodecylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Str	Streptomycin
Str <sup>R</sup>	Streptomycin-Resistenz
TEMED	Tetramethylethylaminomethan
Tet	Tetracyclin
Tet <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenz
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
w/v	<i>weight per volume</i>
w/w	<i>weight per weight</i>
WT	Wildtyp

# 1. Einleitung

Motile Bakterien, wie das Enterobakterium *Escherichia coli*, sind bei einer Länge von nur ca. 2  $\mu\text{m}$  in der Lage, eine Schwimgeschwindigkeit von 40  $\mu\text{m/s}$  zu erreichen. Damit legen sie pro Sekunde das 20-fache ihrer eigenen Körperlänge zurück. Im Vergleich müßte ein 1,80 m großer Mensch 36 m/s oder 130 km/h zurücklegen. Diese enorme Leistung erreichen schwimmende Bakterien durch rotierende Geißeln. Dabei wurden, abhängig von der Bakterien-Spezies, Rotationsfrequenzen zwischen 200 und 1700 Hz gemessen (Lowe *et al.*, 1987; Chen & Berg, 2000; Magariyama *et al.*, 1994). Bakterienflagellen sind die einzigen rotierenden Organelle in der belebten Natur; sie werden von einem Nanomotor angetrieben, der mit der Basis in der Zellmembran lokalisiert ist. Energetisiert wird der Motor durch den Ionengradienten an der Zytoplasmamembran. Die meisten Bakterien nutzen Protonen ( $\text{H}^+$ ) für ihren Antrieb. Der Verbrauch, bei *Streptococcus* bestimmt, liegt dabei bei ca. 1000  $\text{H}^+$ /Umdrehung (Meister *et al.*, 1987). Alkalophile Bakterien energetisieren ihre Motoren mit  $\text{Na}^+$ -Ionen, ein Befund, der zunächst bei *Vibrio sp.* gemacht und eingehend untersucht wurde (Imae & Atsumi, 1989). Motile Bakterien benutzen ihre Flagellen zur „Eroberung“ des Biotops und zum schnellen Erreichen eines optimalen Milieus. Die Fähigkeit, Gradienten von „Lockstoffen“ (oder „Schreckstoffen“) zu erkennen und in gerichtete Schwimmbewegung umzusetzen, nennt man „Taxis“, bei chemischen Reizen „Chemotaxis“. Bakterien haben spezifische Sensoren (Transmembran-Rezeptoren) zur Wahrnehmung von Reizen. Qualität und Stärke von Reizen werden über eine Signalkette (His-Autokinasekette) so auf die Rotation des Flagellenmotors übertragen, daß global betrachtet, eine gerichtete Bewegung zur Optimalkonzentration des Lockstoffs oder zur Minimalkonzentration des Schreckstoffs resultiert. Effiziente Motoren und die Fähigkeit zur Chemotaxis sind das „Rüstzeug“ für ein Überleben in den unterschiedlichsten Habitaten.

Das Enterobakterium *E. coli* wurde in den 60er Jahren als Modell für die genetische und biochemische Analyse der Chemotaxis herangezogen (Adler, 1966). *E. coli* zählt als Vertreter der Enterobakterien zur  $\gamma$ -Subgruppe der Proteobakterien (Olsen, 1994). Enterobakterien wurden so die Prototypen für molekulare Modelle der Chemotaxis. Seit den 90er Jahren wurden verstärkt andere Bakterienarten, wie *Bacillus subtilis* und Vertreter der  $\alpha$ -Subgruppe der Proteobakterien, wie *Sinorhizobium meliloti*, *Caulobacter crescentus*

oder *Rhodobacter sphaeroides* in die Untersuchungen einbezogen (Armitage & Schmitt, 1997; Scharf & Schmitt, 2003). Dabei zeigten genetische, biochemische, physiologische und biophysikalische Analysen, daß das enterobakterielle Paradigma nicht allgemeingültig ist. Unterschiedliche Biotope und phylogenetische Distanz (Ochman & Wilson, 1989) haben dazu geführt, daß teilweise neue Strukturen und Mechanismen des Taxissystems entstanden. Allerdings sind die resultierenden Prinzipien der taktischen „Suchbewegung“ die gleichen. Wie Abb. 1 zeigt, besteht das Schwimmuster von *E. coli* ( $\gamma$ -Proteobakterien) und *S. meliloti* ( $\alpha$ -Proteobakterien) aus geradlinigen „Läufen“ und abrupten Richtungsänderungen („Taumeln“). Die Mechanismen, die zum Schwimmuster führen sind jedoch verschieden. Läufe werden in beiden Fällen durch Bündel schnelldrehender Flagellen hervorgerufen. Das Taumeln wird bei *E. coli* durch Umkehren der Drehrichtung von *ccw* (*counterclockwise*) nach *cw* (*clockwise*) und dadurch verursachtes „Auseinanderfliegen“ der einzelnen Flagellen erreicht (Berg, 2000; Berg & Brown, 1972); *S. meliloti*-Flagellen dagegen erhalten ihre Drehrichtung (*cw*) aufrecht, verlangsamen aber die Rotationsgeschwindigkeit einzelner Flagellen in asynchroner Weise, so daß ebenfalls ein Auseinanderfliegen des Bündels und Richtungsänderung resultieren (Götz & Schmitt, 1987; Platzer *et al.*, 1997; Schmitt, 2002; Scharf, 2002). Folglich funktioniert der Flagellenmotor von *E. coli* (*ccw-cw*) anders als der von *S. meliloti* (schnell-langsam). Voraussetzung für diese verschiedenen Rotationsmodi sind molekulare Unterschiede in der Motorstruktur von *S. meliloti*, von denen zwei Thema dieser Arbeit sind.

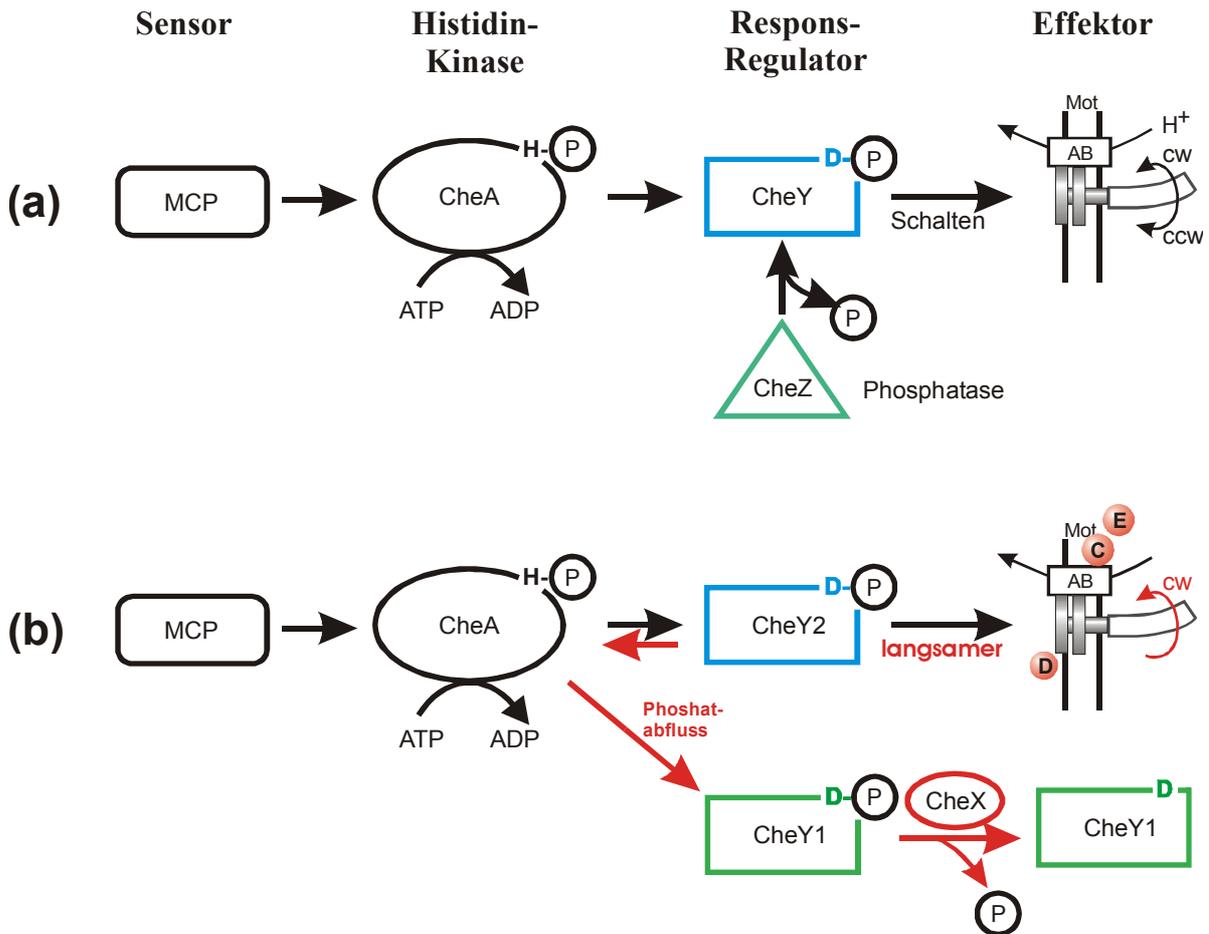


**Abb. 1.** Schwimmmodi (oben) und Flagellenrotation (unten) von *E. coli* und *S. meliloti*. *cw* = *clockwise*, *ccw* = *counterclockwise* (nach Scharf & Schmitt, 2003).

Wie werden taktische Signale aufgenommen und verarbeitet, um schließlich eine Rotationsumkehr oder -verlangsamung auszulösen? Bakterien besitzen spezifische „Zwei-Komponenten-Systeme“, die als Signalkette dienen. Diese besteht aus einer zentralen Histidin-Autokinase (CheA) und einem oder mehreren nachgeschalteten Responsregulatoren (CheY). Externe chemische Reize werden zunächst von spezifischen Transmembranrezeptoren, sogenannten methylierbaren Chemotaxisproteinen (MCPs), erkannt. Die externe Ligandenbindung löst eine interne Methylierung von Glutamatresten an den MCPs aus; die Anzahl methylierter Reste gilt als endogene Repräsentation der Reizstärke. Ein von den MCPs ausgehendes Signal blockiert die CheA-Autokinase, das Fehlen von Signalen aktiviert CheA und resultiert in einer ATP-abhängigen Autophosphorylierung von His48 im N-terminalen Bereich von CheA. Im folgenden benutzen *E. coli* und *S. meliloti* unterschiedliche Mechanismen zur Signalweiterleitung. Im enterobakteriellen System (Abb. 2a) überträgt phosphoryliertes CheA (CheA-P) seine Phosphatgruppe auf ein konserviertes Asp57 des Responsregulators CheY. Die Wechselwirkung des aktiven CheY-P mit FliM an der cytoplasmatischen Oberfläche des Basalkörpers (C-Ring) führt zur Änderung der Rotationsrichtung des Flagellenmotors von ccw nach cw (Welch *et al.*, 1994). Durch Mutation wurde das N-terminale Ende von FliM als Bindestelle von CheY-P identifiziert (Bren und Eisenbach, 1998). Die ausgelöste Taumelreaktion von ca. 0,1 s wird sofort wieder von einem Lauf abgelöst. Deshalb muß der aktivierte Responsregulator CheY-P sehr schnell dephosphoryliert werden. Dazu reicht der spontane Zerfall (Halbwertszeit: 10 s; Lukat *et al.*, 1992) nicht aus. Deshalb wird eine effiziente Phosphatase, CheZ, benötigt, die durch Bindung an CheY-P zur 100-fach beschleunigten Dephosphorylierung des Responsregulators führt (Hess *et al.*, 1988).

Der Signaltransduktionsweg von *S. meliloti* (Abb. 2b) weist im Unterschied zum enterobakteriellen System zwei Responsregulatoren, CheY1 und CheY2, auf, besitzt jedoch keine CheZ-Phosphatase. Aktiviertes CheY2-P ist der dominante Responsregulator, der eine Rotationsverlangsamung des Flagellenmotors auslöst. CheY1 dient als Phosphatabfluß und ersetzt so CheZ (Sourjik & Schmitt, 1996; Sourjik & Schmitt, 1998). Anders als im *E. coli*-Signalsystem wird im *S. meliloti*-System die Phosphatgruppe von CheY2 auf CheA zurückübertragen (Retrophosphorylierung). CheA überträgt seinerseits Phosphat auf CheY1, welches das Phosphat aufnimmt. Die CheY2-Dephosphorylierung und die CheY1-Phosphorylierung verlaufen in einer 70-100 ms-Kinetik, die Halbwertszeit des Spontanzerfalls von CheY1-P liegt in der Größenordnung von 10 s (Sourjik & Schmitt, 1998). In der Zelle liegt CheY1 im 10-fachen Überschuß in Relation zu CheA vor (Sourjik

& Schmitt, 1998), trotzdem reicht bei starker taktischer Reizung die CheY1-Menge nicht zur Aufnahme des „retrotransferierten“ Phosphats. Ein kürzlich analysiertes kleines 10 kDa-Protein, CheX, scheint hier den Zerfall von CheY1-P zu beschleunigen (Abb, 2 B; Schilling, 2004). Dieser Zusammenhang wird in der Arbeitsgruppe derzeit intensiv untersucht.

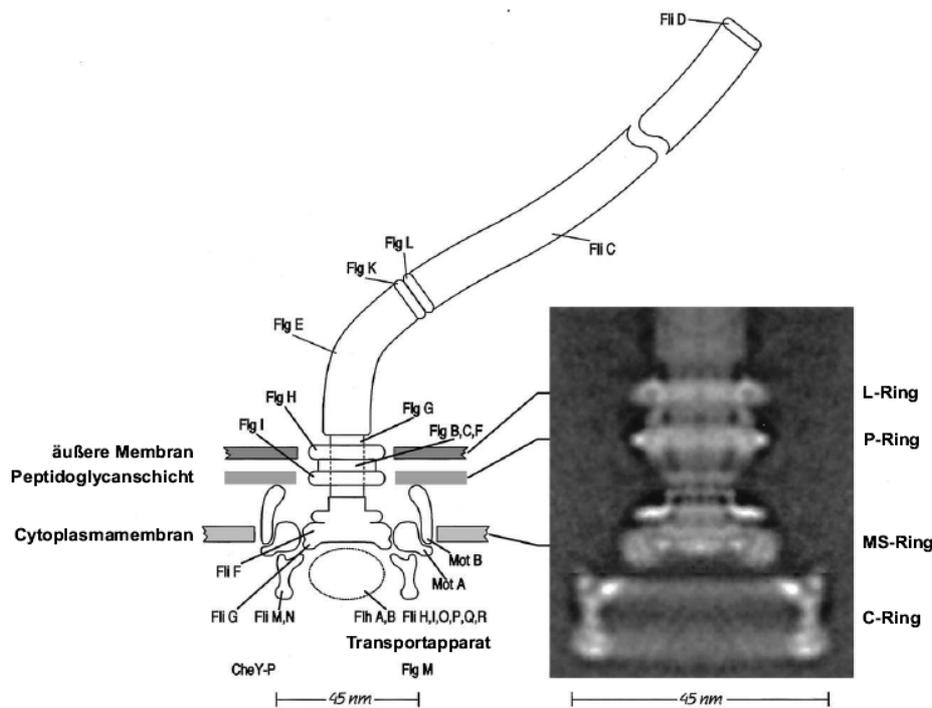


**Abb. 2.** Vergleich der sensorischen Signaltransduktionsketten von *E. coli* (a) und *S. meliloti* (b). Funktionell analoge Komponenten sind mit gleichem Farbcode dargestellt. Rote Symbole markieren neue Komponenten/Reaktionsschritte des *S. meliloti* Systems; cw = clockwise; ccw = counterclockwise; Che = Chemotaxis; CheA = Histidinkinase; CheY, CheY1, CheY2 = Responsregulatoren; CheX = cytoplasmatische Komponente mit Phosphataseaktivität bzgl. CheY1-P; CheZ = Phosphatase; D-P = Aspartylphosphat; H+ = Protonen(fluss); H-P = Histidylphosphat; MCP = *methyl-accepting chemotaxis protein*; Mot = Motilität; MotA, MotB, C, D, E = Motorproteine (Verändert nach Schmitt, 2002).

Effektor des Chemotaxis-Systems und Basis bakterieller Bewegung ist die rotierende Geißel. Jede *E. coli*-Zelle besitzt sechs bis acht peritrich insertierte Geißeln, die in gemeinsamer Rotation zum Bündel vereint die schwimmende Zelle vorantreiben. Dabei gleicht der Antrieb dem einer Schiffsschraube. Diese einzigartigen, rotierenden Bewegungsorganelle werden in drei morphologische Abschnitte gegliedert: a) das lange helikale Filament und b) den Haken, als zellexterne Elemente, und c) den Basalkörperkomplex, der die äußere Membran, die Peptidoglycanschicht und die Zytoplasmamembran durchspannt. Im proximalen Teil des Basalkörpers, dem Flagellenmotor, wird das Drehmoment generiert; die Energie dafür liefert der Fluss von Protonen durch den Ionenkanal aus MotA- und MotB-Molekülen. Das bakterielle Flagellum besteht insgesamt aus ca. 40 verschiedenen Proteinkomponenten (Berg, 2003), denen zum Großteil eine genaue Funktion zugeordnet werden konnte. Das Filament ist aufgebaut aus mehreren tausend Kopien von Flagellinmonomeren (FliC), die einen Helixzylinder bilden (Samatey *et al.*, 2001). Im elektronenmikroskopischen Bild zeigen die schraubenförmigen Filamente von Enterobakterien eine schwach strukturierte Oberfläche mit 11 longitudinalen Helixlinien; die Filamente werden auch als „glatt“ bezeichnet (Schmitt *et al.*, 1974). Die einzelnen FliC-Monomere können mehrere Konformationen einnehmen, wobei die L- und die R-Form die beiden Extreme darstellen (Samatey *et al.*, 2001). Bei Rotation des linkshändig-helikalen Filaments gegen den Uhrzeigersinn (ccw) nehmen die Monomere die L-Form ein und ermöglichen so die Bündelung mehrerer Filamente. Kehrt sich die Rotationsrichtung einzelner Geißeln, ausgehend von der Basis, um (cw), wechseln die Monomere sukzessive in die R-Form und es bilden sich partiell rechtshändige Filamente. Einzelne Filamente nehmen eine *semicoiled* Struktur an, das Bündel fällt auseinander. Den Übergang von L-Form zu R-Form wird als polymorphe Transition bezeichnet (Hotani, 1980). Neben Linkshändigkeit sämtlicher Filamente setzt die korrekte Bündelung auch eine definierte Hakenlänge von 55 nm voraus (Hirano *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 1996). Der flexible Haken ist aus ca. 120 FlgE-Monomeren aufgebaut. In *Salmonella* und *E. coli* wurde das Protein FliK als Hakenlängenregulator identifiziert und charakterisiert. Fehlt FliK, kommt es zu abnorm verlängerten Haken, sogenannten *polyhooks* (Kawagishi *et al.*, 1996; Patterson-Delafield *et al.*, 1973; Suzuki & Iino, 1981).

Der Basalkörperkomplex besteht aus einem rotierenden Schaft mit vier aufgesetzten Ringen, von denen die beiden oberen (L- und P- Ring) als Drehlager in der Zellwand verankert sind (Francis *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 2001), die beiden unteren (MS- und C-

Ring) als Schwungrad und Motor in fester Verbindung mit der Zentralachse stehen. Der C-Ring, der aus FliG, FliM und FliN Monomeren besteht, wird auch als *switch*-Komplex bezeichnet (Yamaguchi *et al.*, 1986). Der Fluß von Protonen ( $H^+$ ) durch radial angeordnete Ionenkanäle (Khan *et al.*, 1988) erzeugt Kräfte, die am Rotor angreifen und diesen samt der Geißel in Drehung versetzen. Dabei wird elektrochemische in mechanische Energie umgewandelt. Die Protonenkanäle werden in einer 2:4 Stöchiometrie pro Untereinheit aus den Proteinen MotA und MotB gebildet (Braun & Blair, 2001; Zhou *et al.*, 1998). Jedes MotA-Molekül durchspannt mit vier (Zhou *et al.*, 1995), jedes MotB Molekül mit einer Transmembranhelix die Cytoplasmamembran (Chun & Parkinson, 1988). Nach einem aktuellen Konzept würde die Umwandlung in Bewegung im MotA-MotB-Stator vollzogen und anschließend über Coulomb-Kräfte auf den Rotor übertragen (Schmitt, 2003).



**Abb. 3.** Schematische Darstellung des enterobakteriellen Flagellenmotors im Vergleich zu einer Rekonstruktion aus EM-Aufnahmen. L-Ring = mit der Lipopolysaccharidschicht assoziierte Halterung, gebildet von FlgH; P-Ring = mit der Peptidoglycanschicht assoziierte Halterung, gebildet von FlgI; MS-Ring = rotierende Scheibe in der Cytoplasmamembran, bestehend aus FliF, bildet zusammen mit FliG den Rotor; FliM, FliN, FliG: Komponenten des Cytoplasma(C)-Rings; MotA-MotB: Protonenkanal mit Zellwandanker (MotB), bildet den Stator; CheY-P, aktivierter Responsregulator; FlhA, FlhB, FliH,I,O,P,Q,R, Flagellenexportapparat; Flg B,C,F,G, Schaftproteine; FlgE, bildet den Haken; FlgK,L, sitzen am Übergang von Haken zum Filament; FlgM, anti-Sigmafaktor; FliC,D, Filamentproteine (Verändert nach Berg, 2003).

Der Effektor Komplex von *S. meliloti* gleicht im Wesentlichen dem der Enterobakterien. Ein Großteil der den *E. coli* und *Salmonella* zugeordneten Komponenten konnte auch bei *S. meliloti* identifiziert werden.

Die neuartigen Merkmale des *S. meliloti*-Motors, nämlich konsequente cw-Rotation und deren Geschwindigkeitsvariation, lassen molekulare Unterschiede im Flagellenapparat vermuten. Tatsächlich wurden veränderte und neue Komponenten entdeckt, die im Folgenden kurz beschrieben werden. Im Gegensatz zum Enterobakterium *E. coli* sind die Geißeln von *S. meliloti* rechtshändige, sogenannte „komplexe“ helikale Filamente, die das Schwimmen in viskosen Medien begünstigen (Götz *et al.*, 1982; Scharf, 2002). Die komplexen Filamente (Krupski *et al.*, 1985; Trachtenberg *et al.*, 1987) bestehen aus vier ähnlichen Flagellinuntereinheiten FlaA, FlaB, FlaC und einem etwas kleineren FlaD (Pleier & Schmitt, 1989; Sourjik *et al.*, 1998; Scharf *et al.*, 2001). Diese Geißeln können keine polymorphen Transitionen zu einer Helix gegenläufiger Händigkeit vollziehen, eine Beobachtung, die mit der ausschließlichen cw-Rotation korreliert. Zusätzlich wurden drei neue Gene, *motC*, *motE* und *motD*, entdeckt, deren Inaktivierung jeweils im immotilen Phänotyp resultiert. Das Genprodukt von *motC* ist an MotB und die Zytoplasmamembran assoziiert (Halbach, 2003; Jäkel, 2004) und bestimmte Mutationen resultieren in einer Verlangsamung der Flagellenrotation (Attmannspacher, 1999; Jäkel, 2004). Deshalb wurde postuliert, daß MotC als „Protonensammler“ (für MotB) oder als „Sensor des Membranpotentials“ fungieren könnte.

Ziel dieser Arbeit war es, Struktur und Funktion der beiden anderen neuen *mot*-Genprodukte, MotD und MotE, im Detail aufzuklären und das Zusammenspiel mit bereits bekannten Komponenten des Basalkörperkomplexes verständlich zu machen. Dabei stellte sich heraus, daß MotE ein periplasmatisches Chaperon und MotD ein Analoges des Hakenlängenlängen-Regulators FliK ist. Deshalb wurde MotD in FliK umbenannt.

## 2. Material

### 2.1 Bakterien und Plasmide

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tab. 1, verwendete Plasmide in Tab. 2 zusammengefasst.

**Tab.1.** Bakterienstämme

Stamm	Marker/Genotyp <sup>1)</sup>	Herkunft/Referenz
-------	------------------------------	-------------------

#### *E. coli*

DH10B	<i>F<sup>-</sup> araD 139Δ(ara leu)</i> <i>7697 ΔlacX74 galU galK</i> <i>mcr A Δ(mrr<sup>-</sup> hsdRMS-mcrBC)</i> <i>rpsL decR 380 ΔlacZ ΔM15 endA1</i> <i>nupG recA1</i>	Bethesda Research Laboratories
S17-1	<i>recA1 endA1 thi hsdR RP4-2-</i> <i>Tc::Mu::Tn7</i> <i>Tp<sup>R</sup> Str<sup>R</sup></i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
ER2566	<i>F<sup>-</sup> λ<sup>-</sup> fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7</i> <i>gene1 gal sulA11 Δ(mcrC-</i> <i>mrr)114::IS10R(mcr-</i> <i>73::miniTn10-TetS)2R(zgb-</i> <i>210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]</i>	New England BioLabs
BL21DE	<i>F<sup>-</sup> ompT lon (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i>	Studier & Moffat, 1986
M15 pREP4	<i>lac ara gal mtl recA<sup>+</sup> uvr<sup>+</sup> (pREP4 lacI</i> <i>Kan<sup>R</sup>)</i>	Stratagene
JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17 (rk.,</i> <i>mk<sup>+</sup>) relA1 supE44 Δ(lac-</i> <i>proAB)(F' traD36proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15)</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985

SCS110	<i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44D (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15]</i>	Stratagene
--------	---	------------

### ***S. meliloti***

RU11/001	Str <sup>R</sup> , spontan streptomycin-resistentes Derivat von RU10/406	Krupski <i>et al.</i> , 1985
RU11/211	Str <sup>R</sup> Δ <i>motC</i>	Platzer <i>et al.</i> , 1997
RU11/212	Str <sup>R</sup> Δ <i>in fliK</i>	Platzer, <i>et al.</i> , 1997
RU11/216	Str <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , RU11/212 komplementiert mit pRU2015	Platzer, <i>et al.</i> , 1997
RU11/218	Str <sup>R</sup> Δ <i>motB</i>	Platzer <i>et al.</i> , 1997
RU11/396	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliN</i>	Sourjik <i>et al.</i> , 1998
RU11/553	Str <sup>R</sup> Δ <i>motE</i>	Eggenhofer <i>et al.</i> , 2004
RU11/800	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliM</i>	Sourjik <i>et al.</i> , 1998
RU11/807	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliF</i>	Sourjik <i>et al.</i> , 1998
RU11/827	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliL</i>	Sourjik <i>et al.</i> , 1998
RU11/842	Str <sup>R</sup> Δ <i>flaA-C</i>	Sourjik <i>et al.</i> , 1998
RU11/845	Str <sup>R</sup> <i>fliM</i> Δ2-10	Scharf, 2003
RU11/846	Str <sup>R</sup> <i>fliM</i> Δ11-20	Scharf, 2003
RU11/861	Str <sup>R</sup> <i>fliM</i> Δ2-15	Scharf, 2003
RU13/023	Str <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , RU11/553 komplementiert mit pRU2208	Eggenhofer <i>et al.</i> , 2004
RU13/024	Str <sup>R</sup> <i>motE</i> C53A	Eggenhofer <i>et al.</i> , 2004
RU13/025	Str <sup>R</sup> <i>motE</i> L97T	Diese Arbeit
RU13/026	Str <sup>R</sup> <i>motE</i> L104T	Diese Arbeit
RU13/027	Str <sup>R</sup> <i>motE</i> L111T	Diese Arbeit
RU13/054	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliG</i>	Scharf, 2003
RU13/136	Str <sup>R</sup> <i>fliK</i> P347A	Diese Arbeit
RU13/137	Str <sup>R</sup> <i>fliK</i> R358A	Diese Arbeit

RU13/138	Str <sup>R</sup> <i>fliK</i> D382A	Diese Arbeit
RU13/139	Str <sup>R</sup> , Neo <sup>R</sup> , RU11/212 komplementiert mit pRU2874	Diese Arbeit
RU13/140	Str <sup>R</sup> <i>fliK</i> -EGFP	Diese Arbeit
RU13/202	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliK</i> , <i>flhB</i> A300T (Supp.mut. 1)	Diese Arbeit
RU13/203	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliK</i> , <i>flhB</i> A300V (Supp.mut. 2)	Diese Arbeit
RU13/204	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliK</i> , <i>flhB</i> A300T (Supp.mut. 3)	Diese Arbeit
RU13/205	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliK</i> , <i>flhB</i> G295E (Supp.mut. 4)	Diese Arbeit
RU13/206	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliK</i> , <i>flhB</i> S323P (Supp.mut. 5)	Diese Arbeit
RU13/207	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliK</i> , <i>flhB</i> A278V (Supp.mut. 6)	Diese Arbeit
RU13/208	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliK</i> , <i>flhB</i> L345P (Supp.mut. 8)	Diese Arbeit
RU13/209	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliK</i> , <i>flhB</i> A300T (Supp.mut. 9)	Diese Arbeit
RU13/210	Str <sup>R</sup> Δ <i>fliK</i> , <i>flhB</i> L320F (Supp.mut. 10)	Diese Arbeit

<sup>1)</sup>Nomenklatur nach Bachmann (1990) und Novick *et al.* (1976)

**Tab.2.** Plasmide

Plasmid	Marker <sup>1)</sup>	Herkunft/Referenz
pK18 <i>mobsacB</i>	Kan <sup>R</sup> <i>lacZ mob sacB</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pBBR1MCS2	Kan <sup>R</sup> <i>lac<sup>P</sup> mob rep</i>	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pEGFP-N1	Kan <sup>R</sup> GFP mut1-Chromophor	Clontech
pQE60	Amp <sup>R</sup> T5 <sup>P</sup> <i>lac<sup>O</sup></i>	Oiagen
pML122	Neo <sup>R</sup> Gen <sup>R</sup>	Labes <i>et al.</i> , 1990
pML123	Neo <sup>R</sup> Gen <sup>R</sup>	Labes <i>et al.</i> , 1990
pTYB1	Amp <sup>R</sup>	New England BioLabs
pTYB11	Amp <sup>R</sup>	New England BioLabs
pRU2015	Neo <sup>R</sup> Gen <sup>R</sup> , Überexpressionsvektor für <i>fliK</i> , <i>SfuI</i> - <i>Bam</i> HI PCR-Fragment (1600bp) in pML122	Platzer <i>et al.</i> , 1997
pRU2274	Tet <sup>R</sup> <i>flaA-lacZ</i> Fusion	Sourjik <i>et al.</i> , 2000
pRU2278	Tet <sup>R</sup> <i>orf38-lacZ</i> Fusion ( <i>mot</i> operon)	Sourjik <i>et al.</i> , 2000

pRU2208	Neo <sup>R</sup> Gen <sup>R</sup> , Überexpressionsvektor für <i>motE</i> , <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III PCR-Fragment (537bp) in pML123	Eggenhofer <i>et al.</i> , 2004
pRU2315	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>fliK</i> , <i>Nde</i> I- <i>Sap</i> I PCR-Fragment (1425 bp) in pTYB1	Scharf, 1999
pRU2316	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>motC</i> , <i>Sac</i> I- <i>Pst</i> I PCR-Fragment (1230bp) in pTYB11	Scharf, 1999
pRU2563	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>motE</i> mit Signalpeptid, <i>Sap</i> I- <i>Eco</i> RI PCR-Fragment (537 bp) in pTYB11	Eggenhofer <i>et al.</i> , 2004
pRU2635	Kan <sup>R</sup> , MotE C53A AS-Substitution, <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III PCR-Fragment (420bp) in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
pRU2636	Kan <sup>R</sup> , MotE L97T AS-Substitution, <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III PCR-Fragment (480bp) in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
pRU2637	Kan <sup>R</sup> , MotE L104T AS-Substitution, <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III PCR-Fragment (480bp) in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
pRU2638	Kan <sup>R</sup> , MotE L111T AS-Substitution, <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III PCR-Fragment (480bp) in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
pRU2639	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>motE</i> C53A mit Signalpeptid, <i>Sap</i> I- <i>Eco</i> RI PCR-Fragment (537 bp) in pTYB11	Eggenhofer <i>et al.</i> , 2004
pRU2866	Kan <sup>R</sup> , FliK P347A AS-Substitution, <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III PCR-Fragment (540bp) in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
pRU2867	Kan <sup>R</sup> , FliK R358A AS-Substitution, <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III PCR-Fragment (540bp) in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit

pRU2868	Kan <sup>R</sup> , <i>FliK</i> D382A AS-Substitution, <i>EcoRI-HindIII</i> PCR-Fragment (540bp) in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
pRU2869	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>fliK</i> , AS 1-349, <i>NdeI-SapI</i> PCR-Fragment (1047bp) in pTYB1	Diese Arbeit
pRU2870	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>fliK</i> , AS 350-474, <i>NdeI-SapI</i> PCR-Fragment (378bp) in pTYB1	Diese Arbeit
pRU2871	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>fliM</i> , <i>NcoI-BglII</i> PCR-Fragment (900bp) in pQE60	Diese Arbeit
pRU2872	Kan <sup>R</sup> , <i>fliK-egfp</i> -Fusion, <i>EcoRI-HindIII</i> PCR-Fragment (1250bp) in pK18 <i>mobsacB</i>	Diese Arbeit
pRU2873	Kan <sup>R</sup> , <i>fliK</i> , <i>BamHI-EcoRI</i> PCR-Fragment (1425bp) in pEGFP-N1	Diese Arbeit
pRU2874	Kan <sup>R</sup> , <i>fliK-egfp</i> , <i>EcoRI-XbaI</i> Fragment (2275bp) in pBBR1MCS2	Diese Arbeit
pRU2875	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>flgE</i> , <i>SapI-XhoI</i> PCR-Fragment (1188bp) in pTYB11	Diese Arbeit
pRU2876	Amp <sup>R</sup> , Expressionsvektor für <i>flhB</i> AS 212-360, <i>SapI-NdeI</i> PCR-Fragment (444bp) in pTYB1	Diese Arbeit

<sup>1)</sup>Nomenklatur nach Bachmann (1990) und Novick *et al.* (1976)

## 2.2 Verwendete Oligonukleotide

Die Primer wurden von den Firmen Metabion und Qiagen bezogen. Die für PCR-Mutagenese und Sequenzierungen verwendeten Primer sind in Tab. 3 zusammengestellt.

**Tab.3.** Primer für die PCR- Mutagenese und Sequenzierung

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>	<b>Verwendung</b>
EE 22	GAA TAC GAG GAC TGG <u>ACG</u> AAG CGC CGC AAC GAT	Innenprimer MotE L97T <i>forward</i>
EE 23	ATC GTT GCG GCG CTT <u>CGT</u> CCA GTC CTC GTA TTC	Innenprimer MotE L97T <i>reverse</i>
EE 24	CAG GCG GAG CTC GGC <u>ACG</u> GTC GAC ATC TAC AAG	Innenprimer MotE L111T <i>forward</i>
EE 25	CTT GTA GAT GTC GAC <u>CGT</u> GCC GAG CTC CGC CTG	Innenprimer MotE L111T <i>reverse</i>
EE 26	GCA GTC <u>GAA TTC</u> ACG GCG CCG CCG EcoRI	Außenprimer MotE L97T, L104T, L111T <i>forward</i>
EE 27	AGC GCT <u>AAG CTT</u> GGC AAC CCG CCA HindIII	Außenprimer MotE L97T, L104T, L111T <i>reverse</i>
EE 28	GAA ATC GAG AAG TTC <u>GCC</u> ACC AAT ATC GCC GAC	Innenprimer MotE C53A <i>forward</i>
EE 29	GTC GGC GAT ATT GGT <u>GGC</u> GAA CTT CTC GAT TTC	Innenprimer MotE C53A <i>reverse</i>
EE 30	GCA GTC <u>GAA TTC</u> GCA TCA AAT CGG EcoRI	Außenprimer MotE C53A <i>forward</i>
EE 31	AGC GCT <u>AAG CTT</u> GAG TTT GCC GGC HindIII	Außenprimer MotE C53A <i>reverse</i>
EE 32	GCA GTC <u>GAA TTC</u> CCG GGA TGG CGA EcoRI	Außenprimer FliK P347A sowie R358A <i>forward</i>
EE 33	AGC GCT <u>AAG CTT</u> TCC CGC GGC TGA HindIII	Außenprimer FliK – P347A und R358A <i>reverse</i>
EE 34	AAG ATC CAG ATG CAC <u>GCC</u> GTC GAC CTC GGC ATG	Innenprimer FliK P347A <i>forward</i>
EE 35	CAT GCC GAG GTC GAC <u>GGC</u> GTG CAT CTG GAT CTT	Innenprimer FliK P347A <i>reverse</i>
EE 36	GTG ACG GCG ACG CTG <u>GCC</u> CTG AAG GAC GAC GAG	Innenprimer FliK R358A <i>forward</i>
EE 37	CTC GTC GTC CTT CAG <u>GGC</u> CAG CTG CGC CGT CAC	Innenprimer FliK R358A <i>reverse</i>
EE 38	GCA GTC <u>GAA TTC</u> GTC GGT GAC GAC EcoRI	Außenprimer FliK D382A sowie D398A <i>forward</i>
EE 39	AGC GCT <u>AAG CTT</u> CGC CTG CGC TCG HindIII	Außenprimer FliK D382A sowie D398A <i>reverse</i>
EE 40	CGC CAG TTG CGC GAC <u>GCC</u> CAG AGC GAA ATG GTG	Innenprimer FliK D382A <i>forward</i>
EE 41	CAC CAT TTC GCT CTG <u>GGC</u> GTC GCG CAA CTG GCG	Innenprimer FliK D382A <i>reverse</i>
EE 42	CAA GGA TTT GCG GTC <u>GCC</u> CAG GTG AAC ATC GTC	Innenprimer FliK D398A <i>forward</i>

EE 43	GAC GAT GTT CAC CTG <u>GGC</u> GAC CGC AAA TCC TTG	Innenprimer FliK D398A <i>reverse</i>
EE 44	CGC CGC AAC GAT TTC <u>ACG</u> AAA CAG GCG GAG CTC	Innenprimer MotE L104T <i>forward</i>
EE 45	GAG CTC CGC CTG TTT <u>CGT</u> GAA ATC GTT GCG GCG	Innenprimer MotE L104T <i>reverse</i>
EE 46	GGT <u>GGA ATT CTC</u> ATG AGG CCT CTT GAC EcoRI	<i>fliK - egfp</i> - Fusion <i>forward</i>
EE 47	GGT <u>TGG ATC CCG</u> CAT GTA GAC GTG GCC BamHI	<i>fliK - egfp</i> - Fusion <i>reverse</i>
EE 48	ATC CAT GGC GGA TGC TGC	Sequenzierprimer <i>fliK</i>
EE 49	TTT GCA GCC GGA AGG CAG G	Sequenzierprimer <i>fliK</i>
EE 50	CGG <u>TGG AAT TCT</u> ATG AGG CCT CTT GAC EcoRI	<i>fliK - egfp</i> - Fusion <i>forward</i>
EE 51	CTG <u>GGT ACC</u> AGG ATG GTG AGC AAG KpnI	Amplifikation von <i>fliK-egfp</i> - Fusionsprotein <i>forward</i>
EE 52	GGT <u>TGG ATC CCG</u> CTA CAT GTA GAC GTG GCC BamHI	Amplifikation von <i>fliK-egfp</i> - Fusionsprotein <i>reverse</i>
EE 53	<u>TCC ATG GCC</u> ATG AGC ACA AGC ACC NcoI	Klonierung <i>fliM</i> in pQE60 <i>forward</i>
EE 54	GCG <u>AGA TCT TTA</u> ACT CAT GAT GTG Bgl II	Klonierung <i>fliM</i> in pQE60 <i>reverse</i>
EE 55	GGT GGT <u>CAT ATG</u> AGG CCT CTT GAC GAG NdeI	Klonierung <i>fliK</i> in pTYB1, ab AS1 <i>forward</i>
EE 56	GGT GGT <u>CAT ATG</u> CTC GGC ATG GTG ACG NdeI	Klonierung <i>fliK</i> in pTYB1, ab AS 349 <i>forward</i>
EE 57	GGT GGT <u>TGC TCT TCC</u> GCA CAT GTA GAC GTG SapI GCC AGC	Klonierung <i>fliK</i> in pTYB1, bis AS Ende <i>reverse</i>
EE 58	GGT GGT <u>TGC TCT TCC</u> GCA GTC GAC CGG GTG SapI CAT CTG	Klonierung <i>fliK</i> in pTYB1, bis AS 349 <i>reverse</i>
EE 61	CGG <u>TGG AAT TCT</u> AGC GAA ATG GTG AAG GCC Eco RI	FliK-EGFP ins Chr.; 270bp vor Ende <i>fliK</i> <i>forward</i>
EE 62	CCT GCG CTC GCA AGG GCG TTA CTT GTA CAG CTC GTC	FliK-EGFP ins Chr.; Ende von EGFP+Überhang aus Seq nach <i>fliK</i>
EE 63	CGC CCT TGC GAG CGC AGG CGT CTG CGA	FliK-EGFP ins Chr.; Sequenz nach <i>fliK</i> <i>forward</i>

EE 64	AGC GCT <u>AAG CTT</u> GAA AGT GGT AGT TGA HindIII	FliK-EGFP ins Chr.; 260bp nach Ende <i>fliK</i> <i>reverse</i>
EE 66	GGT GGT <u>CAT ATG</u> GAG CCG GAC CGG GAT GGC NdeI	Klonierung <i>fliK</i> AS 241-405 in pTYB1 <i>forward</i>
EE 67	GGT GGT <u>TGC TCT TCC</u> GCA GTT GAA GAC GAT SapI GTT CAC	Klonierung <i>fliK</i> AS 241-405 in pTYB1 <i>reverse</i>
EE 72	GGT GGT <u>CAT ATG</u> TTC TGG ACG CGC CAT CAC NdeI	Klonierung <i>flhB</i> AS 212-360 in pTYB1 <i>forward</i>
EE 73	GGT GGT <u>TGC TCT TCC</u> GCA TGT CAC CCG TCT SapI TTG CTG	Klonierung <i>flhB</i> AS 212-360 in pTYB1 <i>reverse</i>
EE 79	AAC CGG AAG CGT CGT TCA GAT	Sequenzierung <i>flhB</i> <i>S. meliloti</i> , Stelle: 6321, <i>forward</i>
EE 80	ACA TCA TGT CGA GCG TGG	Sequenzierung <i>flhB</i> <i>S. meliloti</i> , Pos: 5761, <i>reverse</i>
EE 81	GCT GGT GGA ATT CGG CAA GTC	Sequenzierung <i>flhB</i> <i>S. meliloti</i> , Pos: 5841, <i>forward</i>
EE 82	ATC GAT GAG GCG CAA TTC GGT	Sequenzierung <i>flhB</i> <i>S. meliloti</i> , Pos: 5121, <i>reverse</i>
EE 83	CTC TCG ACG GCT TTC TTG CCA	Sequenzierung <i>fliK</i> <i>S. meliloti</i> , Pos: 16680, <i>forward</i>
EE 84	TCC GGC TCG CTG CCG CCG GTC	Sequenzierung <i>fliK</i> <i>S. meliloti</i> , Pos: 17460, <i>reverse</i>
EE 85	CGC CTC GGC GGT TCG AGA CGG	Sequenzierung <i>fliK</i> <i>S. meliloti</i> , Pos: 17340, <i>forward</i>
EE 86	AGA GAA TCC CGG TCG GGA CGC	Sequenzierung <i>fliK</i> <i>S. meliloti</i> , Pos: 18240, <i>reverse</i>
M 263	GGT GGT <u>TGC TCT TCC</u> AAC ATG AGA ACG GGC SapI GTG TCC	Klonierung <i>flgE</i> in pTYB11 <i>forward</i>
M432	GGT GGT <u>CTC GAG</u> TTA CCG CTT CAG GAT TGA C XhoI	Klonierung <i>flgE</i> in pTYB11 <i>reverse</i>
M 71	CCC GCC GCT GCT TTT GCA CGT GAG	Sequenzierung pTYB11 <i>forward</i>

M 83	GCT CAG CGG TGG CAG CAG	Sequenzierung pTYB11 <i>reverse</i>
M 55	TAA TAC GAC TCA CTA TAC GG	Sequenzierung pTYB1 <i>forward</i>
M 56	ACC CAT GAC CTT ATT ACC AAC CTC	Sequenzierung pTYB1 <i>reverse</i>
M 31	GCT CGT ATG TTG TGT GGA ATT G	Sequenzierung pK18 <i>mobsacB</i>
forward- 40	GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA	Sequenzierung pK18 <i>mobsacB</i>

## 2.3 Chemikalien und Enzyme

**Tab. 4.** Herkunft von Chemikalien und Enzymen

Chemikalien / Enzyme	Herkunft
Acrylamid	Boehringer (Mannheim)
Agarose	Amresco (Solon, OH, USA)
Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics
Ammoniumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Serva (Heidelberg)
Antiseren gegen <i>S. meliloti</i> Proteine (aus Kaninchen)	Pineda (Berlin)
<i>anti-rabbit-Ig, horseradish-peroxidase conjugated, complete antibody (from donkey)</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Bacto Agar	Difco (Augsburg)
<i>Tryptone Peptone</i>	Difco (Augsburg)
<i>Bacto Yeast Extract</i>	Difco (Augsburg)
Biotin	Sigma (Deisenhofen)
Bradford <i>Protein Assay</i>	Bio-Rad Laboratories (Krefeld)
Bromphenolblau	Sigma (Deisenhofen)
BSA	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Chitin-Agarose Beads</i>	New England Biolabs (Schwalbach)
<i>Coomassie Brilliant Blue 250R</i>	Serva (Heidelberg)
<i>Crystal Screen I</i>	Hampton Research (Aliso Viejo)
<i>CrystalScreen II</i>	Hampton Research (Aliso Viejo)
Desoxynukleosidtriphosphate	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)

Dialyseschlauch <i>Spectra/Por</i>	Spectrum Laboratories (Rancho Dominguez, CA, USA)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem (Darmstadt)
DNA peqGold-Leiter-Mix	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
DNaseI	Boehringer (Mannheim)
ECL ( <i>enhanced chemoluminescence detection</i> ) <i>Western blotting kit</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
EDTA	Boehringer (Mannheim)
Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Gentamycin	Sigma (Deisenhofen)
Hepes	Biomol (Hamburg)
<i>High Range Rainbow Markers</i>	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
Hybond ECL Nitrozellulose-Membran und Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire)
IPTG	AppliChem (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma (Deisenhofen)
Magermilchpulver Sucofin	Trade Service International
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen)
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)
Natrium-N-Laurylsarcosin	Sigma (Deisenhofen)
Neomycin	Sigma (Deisenhofen)
<i>Nucleo Spin Plasmid Kit</i>	Macherey Nagel (Düren)
NP-40 (Nonidet-P40)	Sigma (Deisenhofen)
<i>PEG-Ion Screen</i>	Hampton Research (Aliso Viejo)
Phenol	Roth (Karlsruhe)
Ponceau S	Sigma (Deisenhofen)
<i>Precision Plus Dual Color Protein Standard</i>	Bio-Rad Laboratories (Krefeld)
<i>ProofStart</i> DNA-Polymerase	Qiagen (Hilden)
<i>Qiaex II Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Rapid T4</i> DNA Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsenzyme	Boehringer (Mannheim)

	New England BioLabs (Schwalbach)
RNaseA	Boehringer (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	Gibco (Karlsruhe)
TEMED	Sigma (Deisenhofen)
Trifluoressigsäure 25 %	Roth (Karlsruhe)
Tris	USB (Cleveland, OH, USA)
Trypsin	Roth (Karlsruhe)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
VENT-DNA Polymerase	New England BioLabs (Schwalbach)
Whatman 3MM Filterpapier	Whatman (Wiesloch)
Zelluloseacetatfilter	Sartorius (Göttingen)

## 2.4 Nährmedien und Antibiotika

### 2.4.1 Medium zur Anzucht von *E. coli*

LB (Luria broth)	
<i>Bacto Tryptone</i>	10 g
<i>Yeast extract</i>	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
pH 7,2 mit NaOH einstellen	
für LB <sub>0</sub> -Platten:	15g Agar

Verwendete Antibiotikakonzentrationen:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Tetracyclin	10 µg/ml

### 2.4.2 Medien zur Anzucht von *S. meliloti*

#### Bromfield

<i>Bacto Tryptone</i>	400 mg
<i>Yeast extract</i>	100 mg
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	67 mg
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
für Bromfield-Platten:	15 g Agar
für Bromfield-Schwärmplatten	3 g Agar

**TYC** (*T*ryptone *Y*east extract / *C*alcium)

<i>Bacto</i> Tryptone	5 g
Yeast extract	3 g
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0,87 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l
für TYC-Platten	15 g Agar

**RB** (*R*hizobium *B*asal - Medium)

		Stammlösung	Endkonzentration
NaCl	0,1 ml	1 M	0,1 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,1 ml	100 mM	0,01 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,1 ml	1 M	6,1 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,9 ml	1 M	3,9 mM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0 ml	1 M	1,0 mM
FeSO <sub>4</sub> in 1N HCl	0,01 ml	100 mM	0,001 mM
H <sub>2</sub> O	ad 990 ml	-	-

Zugabe nach Autoklavieren:

MgSO <sub>4</sub>	1,0 ml	1 M	1,0 mM
CaCl <sub>2</sub>	0,1 ml	1 M	0,1 mM
Biotin	1,0 ml	2 mg/ml	2 µg/ml
H <sub>2</sub> O	ad 1l	-	-

Verwendete Antibiotikakonzentrationen:

Neomycin	120 µg/ml
Streptomycin	600 µg/ml

## 2.5 Puffer und Lösungen

### 2.5.1 Lösungen für Mini- und Midiplasmidisolierung

- GET:                            50 mM                            Glucose  
   25 mM                            Tris/HCl (pH 7,0)  
   10 mM                            EDTA
- Lyselösung:                    0,2 M                            NaOH  
   1 % (w/v)                        SDS
- 7,5 M Ammoniumacetat
- 70% und abs EtOH
- 3 M Natriumacetat
- Phenol/Chloroform 1:1
- TE:                                10 mM                            Tris/HCl (pH 8,0)  
   1 mM                              EDTA (pH 8,0)

### 2.5.2 Lösungen für die DNA-Auftrennung

- TAE (50×):                    2 M                                Tris/Acetat (pH 8,0)  
   50 mM                            EDTA
- DNA Gel-Ladepuffer:    50%                                Glycerin  
   10 mM                              EDTA  
   0,2% (w/v)                        Bromphenolblau  
   0,2% (w/v)                        Xylen-Cyanol  
   1-fach                                TAE  
   ad 50 ml                            H<sub>2</sub>O

### 2.5.3 Lösungen für die Auftrennung von Proteinen

SDS-Polyacrylamidgel:

	Trenngel		Sammelgel
	10 %	15 %	
H <sub>2</sub> O	3,75 ml	2,83 ml	3,15 ml
38 % Acrylamid/ 2 % Bisacrylamid	1,88 ml	2,8 ml	450 µl
1,5 M Tris	1,68 ml (pH 8,8)	1,68 ml (pH 8,8)	500 µl (pH 6,8)
10 % SDS	75 µl	75 µl	40 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl	10 µl

- Laufpuffer (5×):
 

30,2 g	Tris
188 g	Glycin
100 ml	10 % SDS
ad 2l	H <sub>2</sub> O
pH 8,8 mit HCl einstellen	
- Probenpuffer (2×):
 

1,4 ml	1,5 M Tris (pH 6,8)
23 ml	87 % Glycerin
0,5 ml	10 % SDS
35 ml	H <sub>2</sub> O
- SDS-Ladepuffer:
 

4 ml	10 % SDS
5,3 ml	Probenpuffer (2×)
700 µl	0,5 % Bromphenolblau
- Färbelösung:
 

2,5 g	Coomassie Blue R
90 ml	Essigsäure
450 ml	EtOH
460 ml	H <sub>2</sub> O
- Entfärber:
 

70 ml	Essigsäure
50 ml	EtOH
ad 1l	H <sub>2</sub> O

## 2.5.4 Lösungen zum Transfer von Proteinen

- PBS:
 

5,84 g	NaCl
14,24 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O
2,76 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O
ad 1 l	H <sub>2</sub> O
auf pH 7,5 einstellen	
- Blot-Puffer:
 

11,65 g	Tris
5,86 g	Glycin
400 ml	Methanol
ad 2 l	H <sub>2</sub> O

## 2.5.5 Lösungen für die Proteinreinigung

### 2.5.5.1 Lösungen für die Proteinreinigung mittels IMPACT

- Säulenpuffer:
 

20 mM	Hepes (pH 8,0)
500 mM	NaCl
1 mM	EDTA
- Dialysepuffer:  
 (= FPLC-Puffer A)
 

20 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
0,5 mM	EDTA
- FPLC-Puffer B:
 

20 mM	Tris/HCl (pH 7,5)
0,5 mM	EDTA
1 M	NaCl

### 2.5.5.2 Lösungen für die Proteinreinigung aus *inclusion bodies*

- Zellaufschlußpuffer:
 

20 mM	Tris/HCL (pH7,5)
0,5 mM	EDTA
- Waschpuffer:
 

1 %	Triton X-100
1 mM	EDTA
- Denaturierungspuffer:
 

8 M	Harnstoff
50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
5 mM DTT	DTT
- Renaturierungspuffer 1:
 

50 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
-------	-------------------

- |                           |       |                   |
|---------------------------|-------|-------------------|
|                           | 1 mM  | EDTA              |
|                           | 1 mM  | DTT               |
|                           | 20 %  | Glycerin          |
|                           | 0,1 M | NaCl              |
| • Renaturierungspuffer 2: | 50 mM | Tris/HCl (pH 8,0) |
|                           | 1 mM  | EDTA              |
|                           | 1 mM  | DTT               |
|                           | 10 %  | Glycerin          |
|                           | 0,1 M | NaCl              |
| • Renaturierungspuffer 3: | 50 mM | Tris/HCl (pH 8,0) |
|                           | 1 mM  | EDTA              |
|                           | 1 mM  | DTT               |
|                           | 10 %  | Glycerin          |

### 2.5.6 Lösungen für die Zellfraktionierung

- |                    |          |                   |
|--------------------|----------|-------------------|
| • TEX-Puffer:      | 50 mM    | Tris/HCl (pH 8,0) |
|                    | 3 mM     | EDTA              |
|                    | 0,1 %    | Triton X-100      |
| • Aufschlußpuffer: | 20 mM    | Tris/HCl (pH8,0)  |
|                    | 10 mM    | MgCl <sub>2</sub> |
|                    | 50 µg/ml | DNaseI            |
|                    | 50 µg/ml | RNaseA            |

### 2.5.7 Lösungen für Reporteragen-Analysen

- |                |                       |                                  |
|----------------|-----------------------|----------------------------------|
| • Z-Puffer:    | 60 mM                 | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> |
|                | 40 mM                 | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|                | 10 mM                 | KCl                              |
|                | 1 mM                  | MgSO <sub>4</sub>                |
|                | 50 mM                 | β-Mercaptoethanol                |
|                | ad 1 l                | H <sub>2</sub> O                 |
|                | auf pH 7,0 einstellen |                                  |
| • ONPG-Lösung: | 4 mg/ml               | ONPG in Z-Puffer                 |
| • Stopplösung: | 1 M                   | Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>  |

## **3. Methoden**

### **3.1 Kultivierung von Bakterien**

#### **3.1.1 Anzucht und Lagerung von *E. coli***

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen auf Agarplatten erfolgte aerob im 37°C Brutschrank (Memmert). Für *E. coli*-Flüssigkulturen wurde LB-Medium (2.4.1) mit einer Einzelkolonie der Ausstrichkultur beimpft. Enthielt der *E. coli*-Stamm ein Plasmid, das eine Antibiotikaresistenz aufwies, so wurde durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums auf dieses Plasmid selektiert. Die Flüssigkultur wurde bei 37 °C im Reagenzglas-Roller (Heidolph) oder Schüttelwasserbad (G76, New Brunswick Scientific) je nach Ansatzvolumen inkubiert. Das Wachstum der Bakterien wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm mittels Bausch und Lomb Photometer verfolgt. Zur langfristigen Lagerung der *E. coli*-Stämme wurden, ausgehend von einer 3ml ÜN-Kultur, 750 µl stationäre Zellen mit 250 µl 60 % Glycerin gemischt, 30 min bei RT inkubiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

#### **3.1.2 Anzucht und Lagerung von *S. meliloti***

Von einer Einzelkolonie ausgehend, erfolgte die Anzucht von *S. meliloti*-Stämmen in TYC<sub>Str</sub>-Vollmedium (2.4.2) zwei Tage bei 30 °C im Reagenzglas-Roller (Heidolph) oder im Schüttelwasserbad (G76, New Brunswick Scientific). Zu Selektionszwecken wurden Flüssigmedien bzw. TYC-Agar-Platten verwendet, die mit entsprechenden Antibiotika supplementiert waren (2.4.2). Für die Anzucht motiler Zellen wurden Bromfield-Platten (2.4.2) mit 15 ml RB-Medium überschichtet, mit 150 µl Zellsuspension einer stationären Kultur beimpft und ÜN im Brutschrank (Memmert) bei 30°C inkubiert. Bei der Präparation der Zellen, die zur dauerhaften Aufbewahrung bestimmt waren, wurde ebenso verfahren, wie für *E. coli* beschrieben.

## 3.2 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

### 3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### 3.2.1.1 Mini-Plasmidisolierung

Nach der Methode von Li & Schweizer (1993) wurde mit einigen Modifikationen Plasmid-DNA in Mengen bis zu 100 µg gewonnen. 3 ml einer ÜN-Kultur wurden in zwei Schritten bei 6.000 Upm jeweils 30 s lang in einer Eppendorf-Zentrifuge abzentrifugiert und das Sediment in 100 µl GET-Lösung mit 4µl RNase (2.3) aufgenommen. Nach Zugabe von 200 µl frischer Lyse-Lösung (2.5.1) wurde der Ansatz mit 150 µl 7,5 M Ammoniumacetat versetzt und 10 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit 0,6 Volumen eiskalten Isopropanols gefällt und erneut 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und nach dem Trocknen in 25 µl Wasser durch Schütteln gelöst.

Bei der DNA-Präzipitation für Sequenzanalysen wurde der *NucleoSpin Plasmid Kit* von Macherey-Nagel (Düren) nach Vorschrift der Hersteller verwendet.

#### 3.2.1.2 Midi-Plasmidisolierung

Bakterien aus einer 100 ml ÜN-Kultur wurden in einer Sorvall-Kühlzentrifuge 8 min mit 6.000 Upm bei 4°C sedimentiert und in 3 ml GET-Lösung (2.5.1) resuspendiert. Die Suspension wurde in SS34-Röhrchen überführt und mit 40 µl RNaseA (10 mg/ml) versetzt. Zum Aufschluß der Zellen wurden 8 ml frische Lyselösung (2.5.1) zugesetzt und der Ansatz 10 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4,5 ml 7,5 M Natriumacetat-Lösung und 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die gefällten Bestandteile in der Sorvall-Zentrifuge 15 min bei 18.000 Upm abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde zur Fällung der DNA in 10 ml kaltes Isopropanol überführt, 15 min bei RT stehengelassen und erneut 15 min mit 18.000 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Zur Reinigung der DNA von Salzen wurde diese mit gekühltem 70 % EtOH gewaschen und getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in 4 ml TE-Lösung (2.5.1) aufgenommen, in ein steriles Sarstedt-Röhrchen überführt, mit Phenol/Chloroform (1:1) versetzt, gut gemischt und 5 min mit 5.000 Upm bei RT in einer Baird & Tatlock Tischzentrifuge zentrifugiert. Der von Proteinen gereinigte Überstand wurde in ein neues Sarstedt-Röhrchen überführt und mit 400 µl 3 M Natriumacetat, sowie mit 8 ml kaltem EtOH (abs.) versehen. Die DNA wurde erneut bei 4 °C 20 min gefällt, 10 min bei RT mit 5.000 Upm sedimentiert und in 400 µl Wasser aufgenommen.

### 3.2.2 Auftrennung von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 1×TAE (2.5.2) als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 120 V. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid zur Gellösung (0,4 mg/ml) wurde die DNA gefärbt, so dass bei Betrachtung auf dem UV-Schirm (Vilber Lourmat TF20M) die Banden detektiert werden konnten. Die genauen Größen der Banden wurden durch Auftragen eines Größenstandards (peqGOLD Leitermix, Peqlab) bestimmt.

### 3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Banden wurden unter UV-Licht (UV-Schirm Chromato-Vue Transilluminator C60, Ultra Violet Products Inc.) mittels eines Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* von Amersham Biosciences gereinigt.

## 3.3 Enzymatische Modifizierung von DNA

### 3.3.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

DNA wurde mit Enzymen der Firma NEB gespalten. Zum Einstellen der optimalen Pufferbedingungen wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet, wobei DNA-Mengen zwischen 0,5 µg und 2 µg für analytische Zwecke und bis zu 10 µg für präparative Anwendungen eingesetzt wurden. In der Regel wurden 3 Einheiten Restriktionsenzym pro 0,5 µg DNA verwendet. Eine „Einheit“ entspricht der Enzymaktivität, die 1 µg Lambda-DNA bei entsprechender Temperatur in 1 h zu spalten vermag. Verdau von Plasmid DNA und durch PCR erzeugte Fragmente erfolgte 2 h bei der für die jeweiligen Enzyme optimalen Temperatur.

### 3.3.2 Alkalische Phosphatase Behandlung

Eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase war bei Vektoren erforderlich, die mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wurden, um eine Religierung zu verhindern. Die alkalische Phosphatase entfernt die Phosphatgruppe am 5'-Ende geschnittener DNA. Aus

dem Gel gereinigter, geschnittener Vektor wurde mit 5  $\mu$ l 10  $\times$  Puffer und 3  $\mu$ l alkalischer Phosphatase (1 U/ $\mu$ l) versetzt und 45 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit dem GFX<sup>TM</sup> *PCR DNA and Gel Band Purification Kit* von Amersham Biosciences gereinigt.

### 3.4 DNA-Techniken

#### 3.4.1 Ligieren von DNA-Fragmenten mit Vektoren

Um DNA-Fragmente stabil vermehren zu können, müssen diese vor der Transformation in einen geeigneten Vektor kloniert werden. Als Vektoren wurden verwendet: pK18*mobsacB*, pTYB1 und pTYB11. Die Ligierung erfolgte in der Regel in einem Volumen von 20  $\mu$ l. Die benötigten Pufferbedingungen wurden mit Hilfe des 5  $\times$  Ligase-Puffers eingestellt. Fragment und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 10:1 eingesetzt. Der Ansatz wurde mit 2 Einheiten T4-Ligase versetzt, mit Wasser auf 20  $\mu$ l aufgefüllt, und 3 h bei 37 °C oder ÜN bei 10-12 °C inkubiert.

#### 3.4.2 Transformation von *E. coli*

Kompetente Zellen von *E. coli* DH10B und ER2566 wurden nach einer Vorschrift von Maniatis *et al.* (1982) hergestellt. Zur Transformation wurden 100  $\mu$ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 20  $\mu$ l Ligierungsansatz (3.4.1) bzw. 2  $\mu$ l Plasmid-DNA gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 90 sec bei 42°C inkubiert, wobei die kompetenten Zellen das Plasmid aufnehmen. Zur Erholung wurden die Zellen 1 h 30 min in 3 ml LB (2.4.1) wachsen gelassen. Nach 5 min Zentrifugation (Tischzentrifuge, Hettich) bei 5.000 Upm und Resuspension im Rücklauf wurden 1/10 und 9/10 auf die entsprechenden Selektionsmedien ausplattiert.

### 3.5 PCR-Methoden

Die Amplifizierung von DNA durch PCR (Saiki *et al.*, 1986) diente zur raschen Gewinnung von DNA-Fragmenten zu Analysezwecken oder Klonierungen. Als Matrizen DNA wurden genomische *S. meliloti*-DNA oder Plasmide verwendet. Für die Herstellung von Fragmenten für die *overlap-extension* PCR und zur Überprüfung von Kreuzungen

wurden sowohl die Taq-, als auch die *ProofStart*<sup>TM</sup> DNA Polymerase verwendet, die eine *proof reading* Aktivität besitzt und sich damit durch eine Reduktion der Fehlerrate auszeichnet.

PCR-Reaktionen wurden in einem Biometra *T gradient* Thermocycler (UNOII) durchgeführt, als Reaktionsgefäße dienten ultradünne PCR *tubes* (Biozym, Hess. Oldendorf).

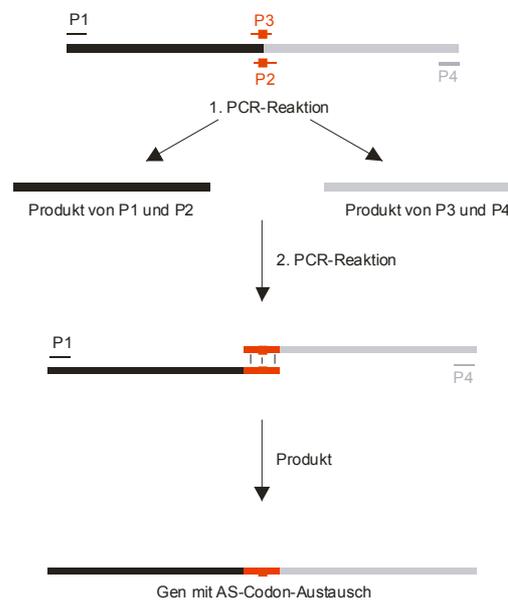
Exemplarischer PCR-Ansatz	
2 µl (100 ng)	Matrizen-DNA
5 µl	10x Puffer
10 µl	Q-Solution
5 µl	2 mM dNTPs
1 µl (100pmol)	Primer 1
1 µl (100pmol)	Primer 2
0,5 µl (1,25 U)	ProofStart-Polymerase
Ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

### 3.5.1 PCR aus einer *S. meliloti*-Einzelkolonie

PCR-vermittelte-DNA-Amplifizierungen konnten direkt aus *S. meliloti*-Zellen durchgeführt werden. Hierzu wurde eine Einzelkolonie von einer Agaroseplatte mit einem sterilen Zahnstocher in ein PCR-Gefäß überführt und zusammen mit H<sub>2</sub>O und Puffer für 15 min auf 95°C erhitzt, um die DNA freizusetzen. Nach Zugabe der restlichen Komponenten konnte der Ansatz für die PCR-Reaktion verwendet werden.

### 3.5.2 Herstellung von AS–Austausch-Mutanten und Einführen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR-Mutagenese (*overlap extension*)

Die Herstellung von Codonsubstitutionen sowie das Einfügen von Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme erfolgte mittels *in vitro* PCR-Mutagenese. Durch die Wahl von vier geeigneten Primern wurde in zwei PCR-Runden ein DNA-Fragment erzeugt, welches das gewünschte mutierte Codon für einen Aminosäurerest enthält.



**Abb. 5.** Fließschema einer PCR- Mutagenese. P1 und P4: Außenprimer; P2 und P3: komplementäre Innenprimer mit gewünschten Basenaustauschen; schwarz: Matrize und Produkt der PCR mit den Primern P1 und P2; grau: Matrize und Produkt der PCR mit den Primern P3 und P4; rot: Region mit neu eingeführten Basenaustauschen.

Die Außenprimer P1 und P4 lagen ca. 250 bp *upstream* bzw. *downstream* von der zu mutierenden Basenfolge. Die Innenprimer P2 und P3 waren komplementär zueinander und zu der die Substitution umgebenden Sequenz, sie enthielten zentral die gewünschten Mutationen. In einer ersten PCR-Runde entstanden in zwei getrennten PCR-Reaktionen jeweils ein Fragment mit 250 bp oberhalb, bzw. unterhalb der Mutation gelegenen

Sequenz. In einer zweiten Runde wurden die gereinigten Fragmente als Matrizen-DNA eingesetzt. In den folgenden Zyklen entstand mit den Außenprimern P1 und P4 als Produkt ein Fragment, das zentral das mutierte Aminosäurecodon enthielt. Die beiden Außenprimer enthielten geeignete Restriktionsschnittstellen als Anhang, die zur gerichteten Klonierung in Vektor-DNA benötigt wurden.

### 3.6 DNA-Sequenzanalysen und Auswertungsverfahren

Alle Sequenzierungen zum Überprüfen der Konstrukte wurden mit einem *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) am Lehrstuhl für Genetik der Universität Regensburg durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit dem GCG-Programmpaket (*Genetics Computer Group*) der *Wisconsin Package* Version 10.0 (1999, Madison, Wisconsin) weiterbearbeitet. Ergänzende Analysen der Nukleinsäure- und Proteindaten wurden mit Programmen im Internet durchgeführt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### 3.7 Konjugativer Plasmidtransfer von *E. coli* nach *S. meliloti*

Die Einführung von Codon-Substitutionen in das Genom von *S. meliloti* erfolgte durch homologe Rekombination zwischen mutierten Sequenzen und Wildtyp-Sequenzen. Zu diesem Zweck wurde der mobilisierbare *suicide*-Vektor pK18*mobsacB* verwendet, der einen Replikations-*origin* für *E. coli* besitzt, jedoch keinen für *S. meliloti* (Schäfer *et al.*, 1994). Nach Klonieren der mutierten DNA-Sequenz in den Vektor wurde *E. coli* S17-1 mit dem rekombinanten Plasmid transformiert (Simon *et al.*, 1983).

Kreuzungen zwischen *E. coli* S17-1 und *S. meliloti* wurden nach der Vorschrift von Simon *et al.* (1983) auf Membranfiltern durchgeführt. Donor und Rezipient aus stationär gewachsenen Kulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 (*E. coli*: 5 x 10<sup>7</sup> Zellen / ml; *S. meliloti*: 1 x 10<sup>8</sup> Zellen / ml) verdünnt und im Schüttelwasserbad bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,2 bis 0,4 inkubiert. Es wurden 250 µl Donorzellen (*E. coli* S17-1 der Zelldichte von 1 x 10<sup>8</sup> Zellen / ml) und 500 µl Rezipientenzellen (*S. meliloti* der Zelldichte von 2 x 10<sup>8</sup> Zellen / ml) in ein ERG überführt und 2 min bei 6.000 Upm zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 µl TYC aufgenommen und auf sterile Celluloseacetat-Filter übertragen, die auf vorgewärmte TYC-Platten aufgelegt waren. Nach 20 h Inkubation bei 30°C wurden die Zellen mit 1 ml TYC-Medium von dem Filter gespült und

Verdünnungen auf Platten mit Selektion auf das Plasmid und den Rezipientenstamm (*S. meliloti*) ausplattiert, so dass nur Zellen mit integriertem Plasmid wachsen konnten. Vier dieser Kolonien wurden auf TYC<sub>SmNm</sub> vereinzelt. Von einer Einzelkolonie ausgehend, wurden die Zellen 2 Tage ohne Selektion auf das Plasmid in TYC<sub>Sm</sub>-Medium angezogen. Während dieser Zeit sollte das zweite Rekombinationsereignis stattfinden. Mit Hilfe des *sacB*-Gens konnte auf das zweite Rekombinationsereignis selektiert werden (Ried & Collmer, 1987; Selbitschka *et al.*, 1993; Schäfer *et al.*, 1994). Von den Zellkulturen wurden Verdünnungen hergestellt und diese auf Bromfield-Platten mit 10% Saccharose ausplattiert. Alle Zellen, die das Plasmid noch enthielten, sollten abgetötet werden. Sie synthetisieren mit Hilfe von SacB, der Levan-Saccharase, aus Saccharose Levane, die von *S. meliloti* nicht verwertet werden konnten. Die Levane häufen sich im Periplasma an, was zum Platzen der Zellen führt. Ca. 50% der Zellen, die auf den Saccharose-Platten anwuchsen, hatten das Plasmid und die damit vermittelte Antibiotikeresistenz durch das zweite Rekombinationsereignis verloren. Von diesen Zellen hatten ca. 10-50% die Wildtypsequenz durch die mutierte Sequenz ausgetauscht. Die homologe Rekombination wurde durch PCR und anschließende Sequenzierung nachgewiesen.

### 3.8 Reportergergen-Analyse (*Miller Assay*)

Die Aktivität von Promotoren in der *S. meliloti* Zelle wurde durch Reportergergen-Analysen (Miller, 1972) bestimmt. Hierzu wurden die mit dem promotorlosen *lacZ*-Gen der Vektoren pRU2274 und pRU2278 (2.1) fusionierten Promotoren durch Konjugation in die zu untersuchende *S. meliloti* Zelle gebracht (3.7). Das im Vektor enthaltene *lacZ*-Gen codiert für *E. coli*- $\beta$ -Galaktosidase, die das in den Reportergergen-Analysen eingesetzte Substrat *o*-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktosid (ONPG) zu Galactose und *o*-Nitrophenolat hydrolysiert. Letzteres ist gelb und hat ein Absorptionsmaximum bei 420 nm.

Die Zellen, die die Plasmide mit dem Promotor-*lacZ* Fusionen enthalten, wurden bis zur Motilität angezogen (3.1.2) und ihre Zelldichte photometrisch (OD<sub>600</sub>, UltrospecIII, Pharmacia, Uppsala, Schweden) bestimmt. Die Menge an eingesetzter Zellkultur betrug jeweils 0,5 ml. Die Proben wurden mit Z-Puffer (2.5.7) auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt und mit einem Tropfen Toluol versetzt, um die Zellmembran für kleine Moleküle wie ONPG permeabel zu machen. Nach 1 h Inkubation bei 37°C lief die eigentliche Reaktion bei 28°C im Schüttelwasserbad ab. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200  $\mu$ l ONPG-Lösung (2.5.7) gestartet. Bei genügender Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe

von 0,5 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung beendet und die Reaktionszeit protokolliert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 14.000 Upm, Eppendorf-Zentrifuge) entfernt und die Absorption des freigesetzten o-Nitrophenolats bei 420 nm gemessen. Die Aktivität der β-Galaktosidase wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{1000 \times \text{OD}_{420}}{t \times v \times \text{OD}_{600}} = \text{Einheiten der } \beta\text{-Galaktosidase (Miller Units)}$$

- OD<sub>600</sub>: Die optische Dichte bei 600 nm ist ein Maß für die Zelldichte.  
OD<sub>420</sub>: Die optische Dichte bei 420 nm entspricht der o-Nitrophenolabsorption.  
t: Reaktionszeit in min  
v: Volumen eingesetzter Zellsuspension in ml

Die spezifische Aktivität der β-Galaktosidase wird in Einheiten pro mg Protein gemessen. Eine Einheit β-Galaktosidase ist definiert als die Menge an Enzym, die 1 nmol ONPG pro Minute bei 28°C hydrolysiert.

## 3.9 Isolierung rekombinanter Proteine

### 3.9.1 Das IMPACT-CN-System

Die in Tabelle 5 angegebenen Proteine wurden mit Hilfe des IMPACT<sup>TM</sup>-CN (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*)- Systems von New England BioLabs gewonnen. Für die Klonierung der Gene *motE*, *motC*, *fliK*, sowie der jeweiligen Mutanten wurden die pTYB Vektoren des IMPACT-Systems verwendet. Die *S. meliloti* Gene wurden mittels PCR amplifiziert (3.5) und über geeignete Schnittstellen in den pTYB1 bzw. pTYB11-Vektor kloniert. Hierbei erfolgte eine N-terminale bzw. C-terminale Fusion des gewünschten Proteins mit dem *Intein-Tag*, ohne dass zusätzliche Aminosäurereste eingefügt wurden. Vektoren, Fusionsart und Schnittstellen sind in Tab. 5 zusammengestellt.

**Tab. 5.** Zur Klonierung der *S. meliloti*-Gene verwendete Vektoren, Art der Fusion mit Intein und Restriktionsschnittstellen sowie zur Reinigung verwendete Chromatographiesäulen und Puffer.

EXPRESSION					REINIGUNG	
Gen	Eigen-schaften	IMPACT-Vektor	Fusion	Klonierungs-Schnittstellen	Säule	Puffer
<i>motC</i>	ohne SP	pTYB11	N-terminal	SapI / PstI	Superdex 75	20 mM Tris, pH7,5; 0,5 mM EDTA
<i>motE</i>	WT	pTYB11	N-terminal	SapI / EcoRI	Superdex 200	20 mM Tris, pH 7,5; 0,5 mM EDTA
	C53A	pTYB11	N-terminal	SapI / EcoRI	Superdex 200	20 mM Tris, pH 7,5; 0,5 mM EDTA
<i>fliK</i>	WT	pTYB1	C-terminal	NdeI / SapI	MonoQ	<b>A</b> : 20 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA ; <b>B</b> : A+ 1M NaCl
<i>flgE</i>	WT	pTYB11	N-terminal	SapI / XhoI	----- <sup>1)</sup>	----- <sup>1)</sup>
<i>flhB</i>	AS 212-360	pTYB1	C-terminal	NdeI / SapI	----- <sup>1)</sup>	----- <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Bei diesen Proteinen wurden die Extrakte der exprimierenden Zellen verwendet.

Die pTYB-Vektoren enthalten einen T7-Promotor, sowie eine Kopie des *lacI*-Gens, das für den Lac-Repressor codiert, um eine stringente Kontrolle über die Expression des Zielgens ausüben zu können. Der Lac-Repressor bindet an die Operator-Sequenz, die unmittelbar stromabwärts des T7-Promotors liegt. Ohne Induktion durch IPTG wird die Expression des fusionierten Gens unterdrückt. Nach Überprüfung der Sequenz wurde der Expressionsstamm *E. coli* ER2566 mit dem erstellten Plasmid transformiert (3.4.2). *E. coli* ER2566 trägt chromosomal im *lacZ*-Gen eine Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens, wodurch dieses Gen unter der Kontrolle des Lac-Promotors steht. Ohne IPTG-Induktion wird die Expression der T7-RNA-Polymerase durch die Bindung des LacI-Repressors an den *lac*-Promotor unterdrückt.

Die optimalen Bedingungen für die Expression wurden durch Vortests (20 ml Kultur in 100 ml Erlenmeyerkolben) ermittelt. Zur Isolierung von rekombinantem Protein wurden 2 bis 6 1 l-Kulturen in LB<sub>amp</sub> (2.4.1) mit je 5 ml ÜN-Kulturen beimpft und im Schüttelwasserbad (G76 New Brunswick Scientific) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,7 wachsen gelassen. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 0,3 mM IPTG. Die Expressionsdauer und -temperatur im Schüttelwasserbad wurde den Erfordernissen des jeweiligen Proteins angepaßt.

Die Zellen wurden gerntet (Sorvall, GSA, 6.000 Upm, 10 min). Zum Aufschluß durch das French Press-Verfahren wurden die Zellen aus 2 l Medium in 20 ml Säulenpuffer (2.5.5.1) aufgenommen. Nach zweimaliger French Press-Passage (800 psi) wurde der Ansatz mit 10 µg/ml DNaseI versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Zellreste und Membranen wurden

durch 30 min Zentrifugation (Sorvall, SS34, 20.000 Upm) entfernt. Der klare Überstand wurde mit einer Flussrate von max. 0,5 ml/min auf eine Chitin-Agarose-Säule aufgetragen, wobei das rekombinante Fusionsprotein über die Chitin-Binde-Domäne an das Säulenmaterial bindet. Nach dem Waschen mit ca. 5 Volumen Säulenpuffer (2.5.5.1) wurden zwei Volumen Säulenpuffer mit 50 mM DTT mit maximaler Flußrate über die Säule gegeben. Der verwendete *Intein-Tag* führt in Gegenwart von DTT an seinem N- bzw. C-terminalen Ende eine Selbstspaltungsreaktion aus, so dass das Zielprotein freigesetzt wird, der *Intein-Tag* selbst aber an den Chitin-Agarose-Beads gebunden bleibt. Im Anschluss erfolgte die Elution des Proteins mit Säulenpuffer (2.5.5.1). Die Fraktionen (2-8 ml) wurden in einem Fraktionssammler aufgefangen und über SDS-Gelelektrophorese analysiert (3.11.3). Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und gegen den für den jeweiligen Versuchsansatz benötigten Puffer dialysiert. Nach Dialyse wurden die Proteine mittels Gelfiltration (Superdex 75, bzw. Superdex 200), oder Anionenaustauschchromatographie (MonoQ HR5/5, Amersham) gereinigt. Dabei verwendete Puffer: Tab. 5.

### 3.9.2 Isolierung von FliM aus *inclusion bodies*

Für die Gewinnung von rekombinantem FliM wurde das Konstrukt pQE60-*fliM* verwendet. Dieses wurde so kloniert, dass ein Stop-Codon die Expression des 6xHis-*Tags* des pQE60 Vektors verhindert. Nach Transformation kompetenter *E. coli* M15pREP4-Zellen (2.1) wurde eine Selektion positiver Transformanten durch Kultivierung auf LB<sub>AmpKan</sub>-Platten erreicht. Das Wachstum einer 1 l Hauptkultur wurde photometrisch bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,7 verfolgt. Durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1mM) wurde die Proteinexpression gestartet. Inkubation der Kultur bei 37°C förderte die Bildung von *inclusion bodies*. Die Zellen wurden bei 6.000 Upm 10 min lang sedimentiert (Sorvall, GSA, bzw. GS3 Rotor), in 15 ml Aufschlußpuffer (2.5.5.2) resuspendiert, mit DNaseI versetzt (2µg/ml) und in drei Durchgängen mit der French Press (900 psi, 40 ml Maxi-Zelle, vorgekühlt) aufgeschlossen. Die Abtrennung der *inclusion bodies* von löslichen Bestandteilen erfolgte durch Zentrifugation (Sorvall, SS34-Rotor, 15.000 Upm, 4°C, 40 min). Dreimaliges Homogenisieren des Sediments in Waschpuffer (2.5.5.2) mit Hilfe eines manuellenn Homogenisators und ein nachfolgender Zentrifugationsschritt (Sorvall, SS34-Rotor, 15.000 Upm, 4°C, 20 min) entfernte Verunreinigungen wie Zell- und Membranreste. Resuspendieren des gereinigten Sediments in Denaturierungspuffer (2.5.5.2) bedeutete die Auflösung der *inclusion bodies*. Das so in Lösung gehaltene FliM

konnte der Gelfiltration zugeführt werden. Zur Reinigung wurde die Superdex 200 HR30/10-Säule (Amersham) verwendet. Als Laufpuffer diente weiterhin der Denaturierungspuffer (2.5.5.2). Pro Lauf wurde 1 ml der FliM Lösung auf die Säule geladen, die Flussrate betrug dabei 0,5 ml/min. Das Elutionsprofil wurde photometrisch bei 280 nm und einer Sensitivität (*range*) von 0,5 bis 2,0 verfolgt. Das fraktionierte gesammelte Eluat wurde auf das Vorhandensein von FliM getestet und entsprechend vereinigt. Sequentielle Dialyse mit den Puffern 1-3 (2.5.5.2, 30 – 50-faches Volumen, je 24h, 4°C) führte zur Renaturierung des Proteins.

## **3.10 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

### **3.10.1 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Biorad *Protein Assay***

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Mit BSA-Lösungen (2 µg/ml bis 16 µg/ml) und einer Referenz ohne Protein wurde eine Eichkurve erstellt. Eine Probe bestand aus 800 µl der BSA-Lösung in Wasser und 200 µl Testlösung. Nach 5 min Inkubation des Ansatzes bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm photometrisch bestimmt. Bei den zu testenden Proteinproben wurde ebenso verfahren. Die fragliche Proteinkonzentration wurde anhand der Eichkurve ermittelt.

### **3.10.2 Proteinkonzentrationsbestimmung durch Aminosäure-Analyse**

Der Bradford *Protein Assay* liefert je nach AS-Zusammensetzung des Proteins oft ungenaue (meist zu hohe) Ergebnisse. Für das Einstellen molarer Verhältnisse, sowie für die Proteinquantifizierung in Zellextrakten (3.11.7) war jedoch der genaue Proteingehalt erforderlich. Aus diesem Grund wurde die Konzentration nach Protein-Totalhydrolyse durch AS-Analyse bestimmt. Dazu wurden 50 µg Protein (nach Bradford Protein Assay) gegen 20 mM Ammoniumacetat, pH 6,5 dialysiert, lyophilisiert und an die Firma Analytical Research & Services (Universität Bern) geschickt. Die erhaltenen Korrekturfaktoren wurden beim Bradford Protein Assay (3.10.1) berücksichtigt.

## 3.11 Immunchemische Methoden

### 3.11.1 Gewinnung von denaturierten Proteinproben

Zur Gewinnung von denaturierten Proteinproben für *Western blot*-Analysen (3.11.4) wurden 1 ml Zellen einer  $OD_{600} = 0,3$  für 8 min in einer Eppendorf-Zentrifuge sedimentiert und in 40  $\mu$ l SDS-Ladepuffer (2.5.3) aufgenommen. Die Ansätze wurden anschließend 10 min aufgekocht und auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

Zur Gewinnung denaturierter Proben von Proteinen in verdünnter Lösung (z.B. periplasmatische und cytoplasmatische Fraktionen) wurde eine TCA-Fällung durchgeführt: 1 ml Lösung wurde mit 30  $\mu$ l Na-Desoxycholatlösung versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Zugabe von 50  $\mu$ l 50% TCA-Lösung initiierte die Fällung der enthaltenen Proteine (Niederschlagsbildung). Nach Inkubation für  $\geq 1$ h bei RT wurde der Niederschlag sedimentiert (14.000Upm, 10 min), der Überstand abgezogen und das Sediment mit kaltem Aceton ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen. Anschließend wurde das Sediment in 40  $\mu$ l SDS-Ladepuffer (2.5.3) aufgenommen und aufgekocht.

### 3.11.2 Affinitätsreinigung von Rohseren

Die Reinigung der Antikörper aus den Rohseren erfolgte nach Scharf *et al.*, 2001. Zur Isolierung der spezifischen Antikörper wurden auf ein SDS-Gele (2.5.3) insgesamt 100  $\mu$ g gereinigtes Protein aufgetragen und aufgetrennt (3.11.3). Das Protein wurde auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham) transferiert (3.11.4) und die Membran mit Ponceau S angefärbt. Die deutliche Protein-Bande wurde exakt ausgeschnitten, mit PBS-Lösung (2.5.4) entfärbt und in kleine Stückchen geschnitten. Diese wurden in einem 2 ml ERG mit 2 ml Rohserum ÜN bei 4  $^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Danach wurden die Membranstückchen nach folgendem Schema gewaschen:

- 3  $\times$  5 min mit 1  $\times$  TBS / 0,1 % BSA
- 2  $\times$  5 min mit 1  $\times$  TBS / 0,1 % BSA + 0,1 % NP-40
- 3  $\times$  5 min mit 1  $\times$  TBS / 0,1 % BSA

Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden durch eine kurze und schnelle Absenkung des pH-Wertes von ihren Epitopen abgelöst. Vorab wurden in 1,5 ml ERGs je 375  $\mu$ l 1 M

KPO<sub>4</sub>-Lösung (pH 9,0) zur Neutralisierung vorpipettiert und auf Eis gestellt. Zu den Membranstückchen wurden 750 µl 0,2 M Glycin/HCl-Lösung (pH 2,5) pipettiert, zur Ablösung der Antikörper 1 min lang manuell geschüttelt und die Lösung mit den von der Membran abgelösten Antikörpern in eines der Neutralisierungs-ERGs überführt. Diese Elution wurde dreimal sukzessive wiederholt, die Eluate vereinigt und der Erfolg der Antikörper-reinigung durch *Western-Blot*-Analyse (3.11.4) überprüft.

### **3.11.3 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE**

Die Proteine wurden in einem 8,5 cm × 9,0 cm großen und 1mm dicken SDS-Gel (2.5.3) aufgetrennt, das aus einem Sammelgel (5 % Acrylamid) und einem Trenngel (10 % bzw. 15 % Acrylamid) zusammengesetzt war (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese wurde mit 1 × SDS-Laufpuffer (2.5.3) in einer Biometra-Gelelektrophoreseapparatur vertikal bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Mit Hilfe von Standardmarkern (*Low Molecular Weight Marker*, Amersham Pharmacia) wurden die Molekularmassen der Testproteine nach *Coomassie*-Färbung (2.5.3) ermittelt.

### **3.11.4 Transfer aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulosemembran (*Western blot*)**

Nach Auftrennung der Proteinproben im SDS-Gel wurden diese mit einer *Tank-Blot*-Apparatur (Biological Laboratories, Harvard University) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond ECL, Amersham) übertragen (90 min; 500 mA in *Blot*-Puffer) (2.5.4).

### **3.11.5 Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz**

Für den immunchemischen Nachweis durch Chemolumineszenz wurde, zur Vermeidung von unspezifischen Wechselwirkungen des Antikörpers, die Nitrocellulose-Membran ÜN bei RT in PBS (2.5.4), 0,1% Tween20, 5% Magermilch geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung erneuert und Rohserum oder gereinigter Antikörper (3.11.2) in einer Verdünnung von 1:1.000 bis 1:100 zugesetzt und 2 h unter Schütteln bei RT inkubiert.

Nach 4x10 min Waschen mit PBS, 0,1% Tween20 wurde der mit Meerrettichperoxidase markierte sekundäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:4.000 in PBS, 0,1% Tween20, 5% Magermilch-Lösung zugesetzt und für 60 min inkubiert. Vor der Detektion wurde die Membran 4x10 min mit PBS, 0,1% Tween20 gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL *Western blotting kit* (Amersham Biosciences). Dazu wurden die Lösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt (Endvolumen 5ml) und die Membran je 1 min 30 sec darin geschwenkt. Nach Platzieren der Membran zwischen zwei Klarsichtfolien wurde diese in eine lichtdichte Kassette gelegt und die Signale mit Hyperfilm-ECL-Filmen (Amersham) nach 2 min bis 2 h Exposition detektiert.

### **3.11.6 Untersuchung von Proteinwechselwirkungen mittels Affinitäts-Western blot**

Der Affinitäts-*Western blot* stellt eine Weiterentwicklung des *Western blot*, wie von Towbin (1979) beschrieben, dar. Der Nachweis eines auf Nitrocellulose-Membran immobilisierten Testproteins beginnt dabei nicht mit einem spezifischen Antikörper, sondern verwendet ein zweites Protein, von dem eine Wechselwirkung mit dem Testprotein erwartet wird. Der anschließend eingesetzte Antikörper richtet sich gegen diesen potentiellen Bindepartner. Bei Wechselwirkung zwischen Testprotein und Bindepartner wird ein Signal an der Position des Testproteins erhalten. Die Gewinnung denaturierter Proteinproben (3.11.1), die Auftrennung über SDS-Page (3.11.3) und der Transfer auf Nitrocellulosemembran (3.11.4) erfolgten wie beschrieben. Die blockierten Membranen wurden mit 20µg (in 10 ml PBS (2.5.4), 0,1% Tween20, 0,5% Magermilchpulver) Bindepartnerprotein überschichtet und ÜN bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde mit einem primären Antikörper gegen das überschichtete Protein detektiert. Ein Signal in Laufhöhe des Testproteins indiziert seine Interaktion mit dem überschichteten Protein.

### **3.11.7 Quantifizierung von *S. meliloti* - Proteinen in Zellextrakten (Quantitative Western blots)**

Die Methode des quantitativen *Western blots* wurde für die Bestimmung der MotC, MotE, FliK und FliM-Molekülzahlen pro Zelle genutzt (Scharf *et al.*, 1998). Für die

Quantifizierung wurde je ein Standard benötigt, der aus den rekombinant exprimierten und gereinigten Proteinen (3.9) bestand. Die genaue Konzentration wurde durch Aminosäure-Analyse bestimmt (3.10.2). Die Standard-Proteine wurden zur Erstellung einer Eichkurve im ng-Maßstab parallel zu den zu quantifizierenden Proben auf 10%ige (MotC, FliK und FliM) bzw. 15%ige (MotE) Gele aufgetragen. Den Standard-Proteinen wurden stets die Zellextrakte der jeweiligen Deletionsstämme mit einer Zelldichte entsprechend 1 ml einer motilen Kultur mit einer  $OD_{600}=0,3$  zugesetzt, um gleiches Lauf- und Detektionsverhalten zu gewährleisten. Die Zellmenge aller Stämme entsprach ebenfalls 1 ml einer Kultur einer  $OD_{600}=0,3$ . Standard-Protein-Ansätze wie auch die zu quantifizierenden Zellen wurden analog 3.11.1 präpariert. Nach *Western blot*-Transfer und Signaldetektion erfolgte die densitometrische Auswertung mit dem Programm *Scion Image/NIH Image* (Version 1.60). Durch Integration von Fläche und Intensität der Proteinbanden wurde eine Eichkurve etabliert. Alle Meßwerte sollten sich innerhalb des linearen Bereichs der Eichkurve bewegen. Durch Vergleich der Intensitätswerte der Proben mit denen der Eichkurve wurden die Proteinmengen aus 1 ml Zellen einer  $OD_{600}$  von 0,3 ermittelt werden. Unter Einbeziehung bekannter Größen (Avogadrokonstante, Zellzahl und Molekulargewichte der Proteine) ließen sich die Molekülzahlen pro Zelle nach folgender Formel bestimmen.

$$\text{Moleküle Protein/Zelle} = N_A * \frac{X / MW}{3,5 * 10^8}$$

$N_A$ : Avogadrokonstante ( $6,022 * 10^{23}$  1/mol)

X: gemessener Wert (ng Protein / 1 ml Zellen einer  $OD_{600}$  von 0,3)

MW: Molekulargewicht des Proteins

### 3.12 Limitierte Proteolyse des FliK-Proteins

Limitierte Proteolysen wurden am Lehrstuhl für Biotechnologie der TU München, von Dr. Martin Haslbeck durchgeführt. In Tris/EDTA, pH 7,5 (2.5.5.1) befindliches FliK-Protein wurde bei Raumtemperatur mit Trypsin versetzt. Das Verhältnis Protein:Protease betrug dabei 600:1 (w/w). Nach dem Start der Inkubation wurden der Probe nach 0,5, 1, 2, 5 und 10 min Proben entnommen und durch TCA-Zugabe gefällt. Nach Zentrifugation der gefällten Spaltprodukte erfolgte die Zugabe von SDS-Ladepuffer (2.5.3) und 5-minütiges

Aufkochen der Probe. Nach SDS-Page (3.11.3) wurde das Gel mit *Coomassie brilliant blue* gefärbt (2.5.3).

### 3.13 Analytische Ultrazentrifugation

Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen mittels Analytischer Ultrazentrifugation wurden von Dr. Martin Haslbeck durchgeführt (TU München, Lehrstuhl für Biotechnologie). Das Molekulargewicht wurde in einer Beckman XL-I analytischen Ultrazentrifuge mit einem Beckman Ti-60 Rotor (Beckman, Fullerton, USA) und einer UV/Vis- und einer Interferenz-Detektionseinheit bestimmt. Zentrifugiert wurde bei 4°C und 13.000 Upm, bis sich das Sedimentationsgleichgewicht eingestellt hatte. FliK wurde in einer Konzentration von 0,4 mg/ml in Dialysepuffer (2.5.5.1) eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels *Origin software package*. Das Molekulargewicht wurde anhand folgender Boltzmann-Gleichung berechnet:

$$c(r) = c(r_0) \exp \frac{M(1-v\rho)\omega^2(r^2-r_0^2)}{2RT}$$

$c(r)$ bzw. $c(r_0)$ :	Makromolekül-Konzentration an der Position $r$ bzw. der festen Position $r_0$
$\omega$ :	Winkelgeschwindigkeit
$R$ :	Gaskonstante
$T$ :	Temperatur in Kelvin
$M$ :	Molekulargewicht
$\rho$ :	Dichte (1,015 g/ml)
$v$ :	spezifisches Volumen von FliK 0,74 ml/g.

Aus der Anpassung des Detektionssignals ( $c$ ) an den Rotationsradius ( $r$ ) resultierte das Molekulargewicht  $M$ , unabhängig davon, welches Detektionssystem eingesetzt wurde.

### 3.14 Affinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wurde auf die früher hergestellte *HiTrap*-Säule (Säulenvolumen: 1 ml) zurückgegriffen (Eggenhofer, 2001). Das Säulenmaterial besteht aus hochquervernetzter Agarose, die über Epichlorohydrin kovalent an die Matrix gebunden ist und mit N-hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert wird. An diese Säule wurden 2,5 mg

gereinigtes FliK-Protein gekoppelt (Eggenhofer, 2001). Pro Durchgang wurde gesamtlösliche Fraktion (3.11.1) aus 500 ml motilen Zellen (3.1.2) auf die mit Aufschlußpuffer äquilibrierte *HiTrap*-Säule aufgetragen, wobei die Flußrate maximal 0,2 ml/min betrug. Nicht gebundene Proteine wurden in einem Waschschrift mit 20-30fachem Säulenvolumen Aufschlußpuffer entfernt. Gebundene Proteine wurden durch rasche Absenkung des pH-Wertes mit einer 0,2 M Glycin/HCl-Lösung (pH 2,5) eluiert. Dabei wurden 4 × 2 ml Elutionsfraktionen gesammelt und deren Proteingehalt bestimmt (3.9.1). Protein-enhaltende Fraktionen wurden einer TCA-Fällung unterzogen.

### 3.15 Aggregationshemmung von MotC

Aggregationskinetiken von MotC ± MotE wurden von Dr. Martin Haslbeck (TU München, Lehrstuhl für Biotechnologie) mit einem Jasco V-550 Spektrophotometer (Jasco, Groß-Umstadt) gemessen. Eine auf 48°C thermostatierte, mit Rührer ausgestattete Quarzküvette enthielt 4,5 µM MotC in 40 mM Hepes-KOH, pH 7,5. Die thermische Aggregation von MotC wurde durch die sich ändernde Lichtstreuung bei 360 nm über 40 min verfolgt. Die Hemmung der Aggregation durch Zugabe von 1,0 bzw. 1,5 µM MotE wurde gemessen. In Kontrollversuchen wurden dem MotC-Protein BSA oder ImmunglobulinG zugesetzt, um unspezifische Aggregationshemmung auszuschließen.

### 3.16 Auftrennung von *S. meliloti* -Zellfragmenten

Die Auftrennung von Zellfragmenten erfolgte nach der TEX-Methode (Thorstenson *et al.*, 1997). 250 ml motile *S. meliloti* Zellen (OD<sub>600</sub> = 0,2-0,4) wurden zentrifugiert (Sorvall, GSA-Rotor, 6.000 Upm, 4°C, 10 min) und in 2 ml TEX Puffer (2.5.6) resuspendiert. Nach Inkubation von 45 min auf Eis wurde erneut zentrifugiert (5000x g, 4°C, 5 min) und das Sediment mit 2 ml TEX-Puffer gewaschen. Die vereinigten Überstände beider Zentrifugationsschritte stellten die periplasmatische Fraktion dar. Das Sediment wurde in 4 ml Aufschlußpuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dreimaliger French Press-Passage bei 20 000 psi wurden nicht aufgeschlossene Zellen durch Zentrifugation (2.000 x g, 2 min) entfernt. Aufgeschlossene Zellen wurden zentrifugiert (Ultrazentrifuge, Beckman, 160.000 x g, 4°C, 90 min), wobei der resultierende Überstand

die cytoplasmatische Fraktion und das Sediment die Membranfraktion repräsentierten. Gesamtzellextrakte wurden analog präpariert, jedoch ohne TEX-Behandlung. Vor Aufnahme in SDS-Ladepuffer wurden periplasmatische und cytoplasmatische Fraktion mit TCA gefällt (3.11.1).

### 3.17 Präparation von *S. meliloti*-Flagellen

250 ml motile Zellen wurde wie unter 3.1.2 beschrieben angezogen und bei 7.000 Upm 8 min im GSA-Rotor sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 70 ml RB-Medium (2.4.2) aufgenommen. Das Abscheren der Flagellen erfolgte im Braun Mixer bei höchster Stufe über 20 sec. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei 11.000 Upm im SS34-Rotor der Sorvall-Kühlzentrifuge sedimentiert, der Überstand wurde in ein frisches Röhrchen überführt und 1 h bei 14.500 Upm im SS34-Rotor zentrifugiert, um Zellen und Zellbestandteile vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Flagellen in einer Beckman-Ultrazentrifuge bei 35.000 Upm im 60 Ti-Rotor 2h bei 4°C sedimentiert. Das Sediment, das die Flagellen enthielt wurde im Rücklauf (ca. 500 µl) aufgenommen.

### 3.18 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmarkierung des FliK-Proteins erfolgte zum einen als trans Expression des FliK-EGFP Fusionsproteins von dem kodierenden Vektor im *fliK*-Deletionsstamm, zum anderen wurde das Fusionskonstrukt in das *S. meliloti*-Genom über homologe Rekombination integriert (3.7). Zur Anzucht wurden Bromfield-Platten (2.4.2) mit 10 ml RB-Medium (2.4.2) überschichtet und mit 200-500 µl *S. meliloti*-Zellen in stationärer Phase angeimpft und 15 h bei 30°C inkubiert. Zur korrekten Faltung des EGFP wurden die Zellen weitere 4 – 8 h bei 16°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf einem Kunststoff-Objektträger fixiert, der zentral eine 1,5 x 1,5 cm Aussparung aufwies. Darüber wurde ein Deckgläschen mit 10 µl Bakteriensuspension und einem Agaroseblöckchen (1%) befestigt. Die Lokalisierung der EGFP-Fluoreszenz in der Zelle erfolgte an einem LSM 510-Meta konfokalen *Laser-scanning* Mikroskop (Zeiss) mit einem 100 x PlanApochromat Objektiv (N.A. = 1.4). Die Fluoreszenz-Signale von EGFP wurden nach Anregung durch einen Argon-Laser (Wellenlänge: 488 nm) mit der Emissionswellenlänge 507 nm detektiert.

Dabei wurde ein 505-550 nm Emissionsfilter verwendet. Die Bearbeitung der entstandenen Bilder erfolgte mittels LSM-5 *Image Browser*-Software von Zeiss.

### 3.19 Elektronenmikroskopie

Die Abscherpräparate von Flagellen (3.17) wurden mit 3 % Uranylacetat negativ kontrastiert. Dazu wurden die Proben auf einem dünnen, nahezu elektronentransparenten Kohlenstofffilm gespreitet und fixiert. Kontrastierung und Elektronenmikroskopie wurden von PD Dr. Reinhardt Rachel (Universität Regensburg, Lehrstuhl für Mikrobiologie) durchgeführt.

### 3.20 Analyse des Schwärmverhaltens motiler *S. meliloti*-Zellen

Motilität und chemotaktisches Potential von *S. meliloti* Wildtyp und diverser Mutanten wurden auf Bromfield-Schwärmplatten (2.4.2) getestet. Dazu wurden 3 µl einer TYC-Kultur stationärer *S. meliloti*-Zellen punktförmig auf eine Bromfield-Schwärmplatte aufgetragen und nach drei Tagen Inkubation bei 30°C der Durchmesser Schwärmrings ausgemessen. Die ermittelten Schwärmring-Durchmesser wurden (abzüglich 5 mm Animpfpunkt) in Relation zum Wildtyp gesetzt, der identisch mit den zu messenden Mutanten aufgetragen worden war.

### 3.21 Analyse der Schwimgeschwindigkeit von motilen *S. meliloti*-Zellen

Zur Bestimmung der Schwimgeschwindigkeit von motilen Zellen wurden Bromfield-Agarplatten (2.4.2) mit 10 ml RB-Minimalmedium (2.4.2) überschichtet. Diese wurden mit 20 und 50 µl einer stationär gewachsenen *S. meliloti*-Kultur angeimpft und ÜN bis zur OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden am nächsten Tag 30 min an eine konstante RT von 22°C adaptiert und anschließend mikroskopisch (Standard 14 Phasenkontrast Mikroskop, Zeiss) auf Motilität untersucht. Die Schwimgeschwindigkeit der im Medium frei beweglichen Zellen wurde mit Hilfe des computergestützten *Hobson Bactracker Systems* (*Hobson Tracking Systems Ltd.*, GB) gemessen. Zur Charakterisierung der Chemokineseigenschaften wurden die Zellen mit 10 mM Prolin stimuliert und

gleichfalls die Schwimmgeschwindigkeit bestimmt. Von jedem Stamm wurden fünf unabhängige Proben an fünf verschiedenen Tagen untersucht. Jede Probe wurde fünfmal vermessen, wobei jedes Ergebnis 200 Einzelspuren berücksichtigte und mittelte. Die Mittelwerte der fünf Messungen ergaben den Wert einer Probe. Für die Charakterisierung von Schwimmgeschwindigkeit und Chemokinese wurden die Mittelwerte der fünf Proben verwendet.

## 4. Ergebnisse

Der Flagellenmotor von *S. meliloti* unterscheidet sich hinsichtlich seines Rotationsmodus (schnell-langsam) von dem der Enterobakterien (ccw-cw). Damit korreliert die Entdeckung drei neuer Gene, *motC*, *motE* und *fliK* (ehem. *motD*), deren Inaktivierung durch Deletion zu einem immotilen Phänotyp führt. Deletionsmutanten von *motC* und *motE* tragen eine normale Ausstattung an Flagellen, die aber paralytisch sind (Platzer *et al.*, 1997); einer *fliK*-Deletion fehlen die Flagellenfilamente, was in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte. Die Gene *motC* (1302 bp) und *fliK* (1425 bp) sind mit *motB* Teil eines *mot*-Operons; *motE* (540 bp) liegt im *flg*-Operon zwischen den Genen *flgI* (P-Ring) und *flgH* (L-Ring) (Sourjik *et al.*, 1998). Ein Schema des Flagellums mit Zuordnung der bekannten Komponenten ist im Anhang (A.3) abgebildet.

### 4.1 Die Rolle von MotE im Flagellenmotor von *S. meliloti*

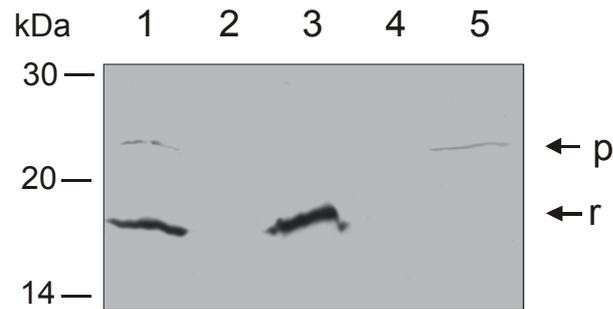
Die Genprodukte von *motC* und *motE*, die im Folgenden untersucht werden, weisen Signalpeptide auf; die Sekretion von MotC ins Periplasma wurde experimentell bestätigt (Platzer *et al.*, 1997). Frühere Untersuchungen (Attmannspacher, 1999; Haslbeck, 1997) haben gezeigt, daß MotC an die periplasmatische Domäne des H<sup>+</sup>-Kanalproteins MotB bindet und für dessen Funktion unbedingt erforderlich ist. Das MotC-Protein ist auch an die Cytoplasmamembran assoziiert (Halbach, 2003; Jäckel, 2004) und bestimmte Punktmutationen resultierten in einer Verlangsamung der Flagellenrotation. Deshalb wurde postuliert, daß MotC als „Protonensammler“ (für MotB) oder als „Sensor des Membranpotentials“ fungieren könne (Halbach, 2003; Jäckel, 2004). Die ca. 1:1 Stöchiometrie von MotB:MotC könnte ferner bedeuten, daß Assoziation und Dissoziation von MotB-MotC eine Rolle bei der Beschleunigung und Verlangsamung der Flagellenrotation bei *S. meliloti* spielen. Die Bedeutung von MotC für das Funktionieren des Flagellenmotors wird dadurch unterstrichen, daß es für seine korrekte Faltung und Zielfindung ein spezielles Chaperon, MotE, benötigt. Aus früheren Arbeiten war bekannt, daß die Inaktivierung von *motE* durch Deletion zu einer signifikanten Reduktion an MotC-Protein führt (Eggenhofer, 2001). Experimente, die einen MotE/MotC-Zusammenhang belegen sind Gegenstand dieses Abschnitts der Dissertationsarbeit. Die zentralen Ergebnisse wurden bereits publiziert (Eggenhofer *et al.*, 2004).



Abb. 6 zeigt Sequenzvergleiche zwischen bekannten MotE-Proteinen. Neben der Signalpeptidase I-Schnittstelle konnten ein konserviertes Leucinzippermotiv aus den drei Resten L97, L104 und L111, und ein konservierter Cysteinrest an der Position 53 identifiziert werden. Die Bedeutung dieser Reste für die Funktionalität des MotE-Proteins wird in 4.1.10 eingehend erläutert.

#### 4.1.2 Nachweis der periplasmatischen Lokalisation von MotE

Das MotE-Protein weist N-terminal eine Signalsequenz für die Sekretion ins Periplasma auf. Eine Abspaltung des Signalpeptids konnte bereits bei der rekombinanten Expression von MotE in *E. coli*-Zellen nachgewiesen werden (Eggenhofer, 2001). Ein unabhängiger, direkter Nachweis der periplasmatischen Lokalisation von MotE wurde durch die Auftrennung von *S. meliloti*-Zellfraktionen geliefert. Dazu wurden motile *S. meliloti*-Wildtypzellen aufgeschlossen und in Zytoplasma, Periplasma und Membranen fraktioniert. Zur Abtrennung des Periplasmas wurden die geernteten Zellen in Tris-EDTA-Triton Puffer (TEX-Puffer, 2.5.6) resuspendiert und einem Kälteschock unterzogen. Der Überstand der nachfolgender Zentrifugation entsprach der periplasmatischen Fraktion. Der anschließende French-Press-Aufschluß der sedimentierten Sphäroplasten und differentielle Zentrifugation trennten die cytoplasmatische Fraktion von der Membranfraktion. Die Identitäten der gewonnenen Fraktionen wurde durch Aktivitätstests mit geeigneten Markerenzymen überprüft: Periplasma-Fraktion wurde auf alkalische Phosphataseaktivität getestet, die cytoplasmatische Fraktion auf  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (3.8). Die *Western blot*-Analyse der einzelnen Fraktionen mit einem affinitätsgereinigten polyklonalen anti-MotE-Antikörper gab dann Aufschluß über die Lokalisation von MotE in der Zelle.



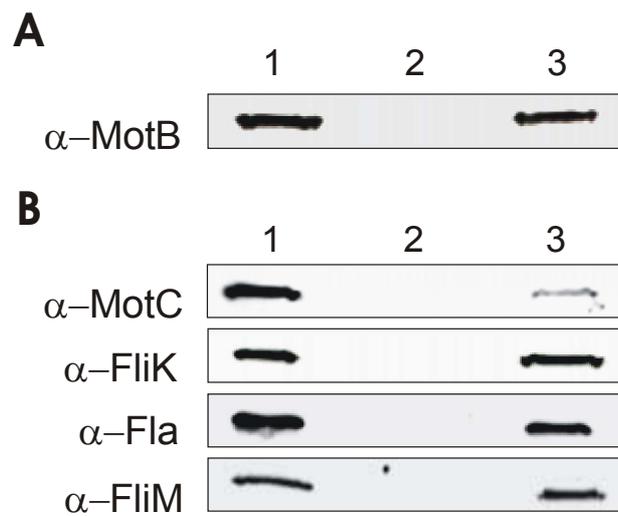
**Abb. 7.** Immunchemische Identifizierung von MotE in aufgetrennten Fraktionen von *S. meliloti*-Wildtyp-Zellen im 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Verdünnung des Antikörpers: 1:100, prä-MotE (p) und reifes MotE (r) mit Pfeilen gekennzeichnet. Spuren: 1, gesamtlösliche Fraktion nach French-Press-Passage; 2, Membranfraktion nach French-Press-Passage; 3, Periplasma nach TEX-Fraktionierung; 4, Membranen nach TEX-Fraktionierung; 5, Zytoplasma nach TEX-Fraktionierung.

Der anti-MotE-Antikörper weist eine dominante 18 kDa-Bande in der gesamtlöslichen Fraktion (Spur 1) und in der periplasmatischen Fraktion nach (Spur 3), die das reife MotE-Protein darstellt. Diese Banden fehlen in der Membranfraktion (Spur 2 und 4). Eine schwache 21 kDa-Bande in der Gesamtlöslichen- (Spur 1) und in der Zytoplasmafraktion (Spur 5) entspricht dem Prä-MotE, das noch nicht sezerniert wurde und folglich das Signalpeptid noch besitzt. Diese Ergebnisse bestätigen die Vorhersage der Lokalisation von MotE im Periplasma und das Resultat einer Peptidsequenzierung des rekombinanten MotE (Eggenhofer, 2001).

#### 4.1.3 Expression und Stabilität von Motor- und Flagellenproteinen in einer *motE*-Deletionsmutante

In einer früheren Arbeit wurde bereits nachgewiesen, daß eine *motE*-Deletion die Expression und/oder Stabilität des periplasmatischen Motorproteins MotC drastisch reduziert. Andere Proteine, wie die Flagelline FlaA-D, FliK oder das C-Ring-Protein FliM, blieben durch die Deletion unbeeinflusst (Eggenhofer, 2001). Ein bekannter Interaktionspartner des MotC-Proteins ist die periplasmatische Domäne von MotB. Unter anderem sind die Stabilisierung oder Aktivierung des MotB-Proteins durch MotC Gegenstand eines aktuellen Motormodells (Platzer *et al.*, 1997; Halbach, 2003; Jäckel, 2004). Deshalb stellte sich die Frage, ob sich eine Deletion von MotE auf Expression

und/oder Stabilität von MotB auswirkt, sei es unmittelbar, wegen des Fehlens von MotE, oder mittelbar, wegen des deutlich reduzierten MotC Gehaltes. In einer  $\Delta motE$ -Mutante (*S. meliloti* RU11/553) wurde die Expression des Motorproteins MotB immunchemisch bestimmt. Die Relevanz der Analyse wurde durch eine Wildtyp-Kontrolle und *motB*-Deletionsmutante gesichert. Abb. 8 faßt die Ergebnisse für die Motorkomponenten MotB, MotC, FliK, die Flagelline und FliM zusammen.



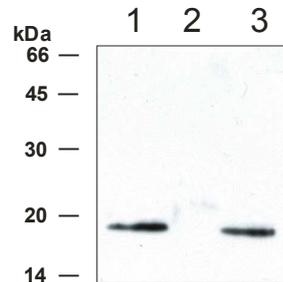
**Abb. 8.** *Western blot* zur Bestimmung der Stabilität von Motorproteinen und Flagellinen in einer *motE*-Deletionsmutante. Verwendet wurden gereinigte polyklonale Antikörper, wie links angegeben, Verdünnung jeweils 1:100, für Flagellinantikörper 1:500. **A:** Stabilität des MotB-Proteins; **B:** Stabilität von MotC, FliK, Flagellin und FliM (Eggenhofer, 2001); Spuren: 1, Gesamtprotein aus RU11/001; 2, Gesamtprotein aus von oben nach unten: RU11/211 ( $\Delta motC$ ), RU11/218 ( $\Delta motB$ ), RU11/212 ( $\Delta motD$ ), RU11/842 ( $\Delta flaA \Delta flaB \Delta flaC$ ), RU11/800 ( $\Delta fliM$ ); 3, Gesamtprotein aus RU11/553 ( $\Delta motE$ ).

Spur 1 in Abb. 8 zeigt die immunchemisch nachgewiesenen Mengen von MotC, MotB, MotD, Flagellin und FliM in Wildtyp-Zellen. Ein Vergleich der Signal-Intensitäten von Spur 1 und Spur 3 spiegelt den Einfluß des Fehlens von MotE auf das jeweils getestete Protein wider. Die Motorkomponenten FliM und FliK blieben wie erwartet unbeeinflusst (Abb. 8, B). Die Menge an exprimierten Flagellinen (Abb. 8, B) entsprach im Rahmen der Schwankungsbreite der des Wildtyps und bestätigte so ebenfalls den elektronenmikroskopischen Befund einer wildtypanalogen Flagellierung (*mot*-Phänotyp, Eggenhofer 2001). Die Menge an MotC-Protein war bei Fehlen von MotE stark reduziert (Abb. 8, B). Das hier untersuchte Protein MotB, welches nachweislich mit MotC interagiert, zeigte sich als normal exprimiert und stabil in einer *motE*-Deletionsmutante

(Abb. 8, A). Damit kann zum einen ausgeschlossen werden, daß MotC allein für die Stabilisierung des MotB Proteins verantwortlich ist, zum anderen wurde dadurch gezeigt, daß MotE direkt nicht für die Stabilität von MotB benötigt wird. Dieses Ergebnis weist eindeutig darauf hin, daß MotE einzig eine Kontrolle auf die Synthese und/oder Stabilität von MotC ausübt. Die Details dieser Kontrolle werden im Folgenden eingehend untersucht.

#### 4.1.4 Expression und Stabilität von MotE in einer *motC*-Deletionsmutante

Zunächst war zu prüfen, ob der Einfluß von MotE auf MotC (4.1.3) einseitig oder wechselseitig ausgeübt wird, d.h. ob auch defektes MotC die MotE-Menge reduziert. Es war zum Beispiel denkbar, daß MotE und MotC einen sich gegenseitig stabilisierenden Komplex bilden. Deshalb wurden die MotE-Mengen im Wildtyp und in einer *motC*-Deletionsmutante verglichen, wie in Abb. 9 gezeigt.



**Abb. 9.** *Western blot* zur Bestimmung der Stabilität des Motorproteins MotE in MotC-defizienten *S. meliloti*-Zellen (Versuchsbedingungen wie in Abb. 8). Verwendet wurde gereinigter polyklonaler MotE-Antikörper, Verdünnung 1:100, links Proteingrößenstandard in kDa, Spuren: 1, Gesamtprotein aus RU11/001; 2, Gesamtprotein aus RU11/553 ( $\Delta$ *motE*); 3, Gesamtprotein aus RU11/211 ( $\Delta$ *motC*).

Der Vergleich der Signalintensitäten von MotE in Wildtyp und  $\Delta$ *motC*-Stamm zeigt deutlich, daß Expression und Stabilität von MotE vom Fehlen des MotC-Proteins unbeeinflusst bleiben. Dieses Ergebnis demonstriert eine einseitige stabilisierende Kontrolle von MotE über Expression und Stabilität von MotC.

#### 4.1.5 Quantifizierung der MotC-Reduktion in der *motE*-Deletionsmutante

Wie groß war die Abnahme der gemessenen Menge von MotC im MotE-defizienten Stamm RU11/553? Zur Beantwortung dieser Frage wurden 14 unabhängige *Western blot*-Analysen von MotC wie in Abb. 8 durchgeführt. Nach Digitalisierung der ECL-Filme mittels Durchlichtscanner wurden die Signalintensitäten mit dem Programm *Scion Image* (NIH-Image) verglichen.

**Tab. 5.** Gemittelte Reduktion der MotC-Menge in *S. meliloti* RU11/553 ( $\Delta motE$ ) relativ zum Wildtyp.

Stamm	RU11/001 (WT)	RU11/553 ( $\Delta motE$ ) <sup>1)</sup>
Gehalt an MotC (in %)	100	29 ± 16

<sup>1)</sup> Wert ermittelt aus 14 unabhängigen *Western blot*-Analysen, Auftrag jeweils 1 ml Zellen mit OD<sub>600</sub> = 0,3

Wie Tab. 10 zeigt, ergab die Mittelung von 14 Signalintensitäten unter den gewählten Kulturbedingungen, daß ohne MotE die Menge an MotC in der Mutantenzelle um 71 % reduziert wurde.

#### 4.1.6 Messung der *motC*-Transkription

Als nächstes war zu testen, ob MotE die Transkription *oder* die Stabilität von MotC beeinflusst. Dazu wurde die Transkriptionsaktivität mit Reportergen quantifiziert. Es wurde das *lacZ*-Gen an den *motC*-Promotor fusioniert (Muschler, 2000) und die synthetisierte  $\beta$ -Galaktosidase in Wildtyp- und RU11/553 ( $\Delta motE$ )-Zellen quantifiziert (3.8). Die gemittelten Werte aus je fünf Messungen sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

**Tab. 6.** Aktivität des *motC*-Promotors<sup>1)</sup>

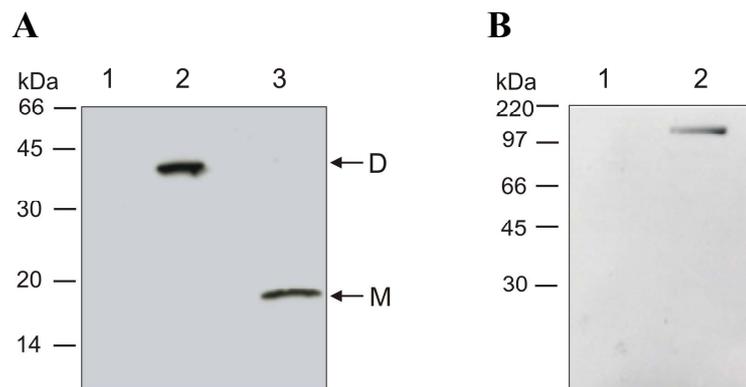
Stamm	RU11/001 (WT)	RU11/553 ( $\Delta motE$ )
$\beta$ -Galaktosidase- Aktivität <sup>1)</sup> (Miller Units)	242 ± 7	244 ± 20

<sup>1)</sup> Die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität nach Miller (1972) wurde aus je fünf unabhängigen Experimenten bestimmt.

Diese Analyse zeigte, daß die *motC*-Transkription im Wildtyp und  $\Delta$ *motE*-Zellen gleich ist. Daraus war zu schließen, daß MotE keine Kontrolle auf die Transkription des *motC*-Gens ausübt. Dies ist ein starkes Indiz für eine Stabilisierung von MotC durch MotE auf Proteinebene.

#### 4.1.7 Wechselwirkung von MotE und MotC

Eine Stabilisierung von MotC durch MotE setzt die Wechselwirkung der beiden Proteine voraus. Eine solche wurde mittels Affinitäts-*Western blot*-Analyse geprüft. Dazu wurden Zellextrakte von *E. coli* ER2566 durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulosemembranen transferiert (3.11). Die Zellen waren entweder mit pRU2316 oder pRU2563 (3.4.2) transformiert und exprimierten demzufolge nach IPTG-Zugabe entweder MotC oder MotE. Membranen mit MotE-enthaltenden Zellextrakten wurden mit gereinigtem MotC überschichtet, Membranen mit MotC-enthaltenden Zellextrakten wurden mit gereinigtem MotE jeweils ÜN inkubiert. Nach Abwaschen des überschüssigen MotC- und MotE-Proteins war im Falle einer gegenseitigen Wechselwirkung zu erwarten, daß überschichtetes Protein an der aufgetrennten membrangebundenen Komponente gebunden worden war und immunchemisch an dieser Position nachzuweisen war. Das Ergebnis ist in Abb. 10 dargestellt.

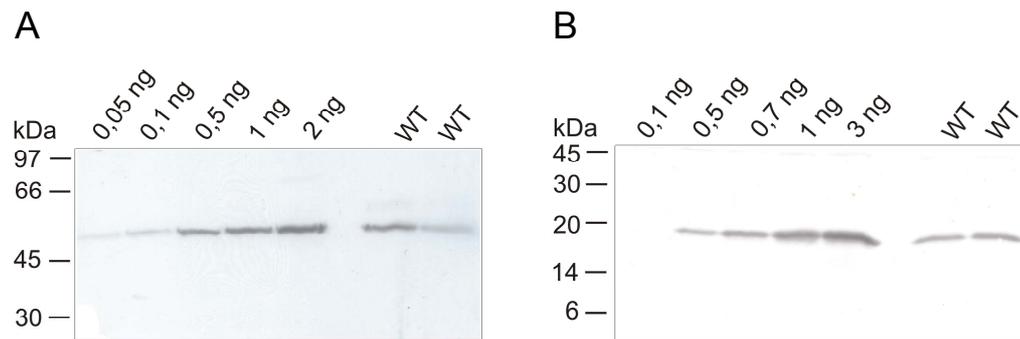


**Abb. 10.** Affinitäts-*Western blot*-Analysen der MotC- und MotE-Bindung. Verdünnung der Antikörper, 1:100; Monomer- (M) und Dimer- (D) Banden mit Pfeilen markiert. **A:** Auftrag von MotE-exprimierenden Zellextrakten, Überschichtung der Blotmembran mit MotC, Detektion mit anti-MotC Antikörper; Spuren: 1, Zellen ohne IPTG; 2, Zellen mit 0,3 mM IPTG induziert; 3, Zellen mit 0,3 mM IPTG induziert, Auftragspuffer mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt **B:** Auftrag von MotC exprimierenden Zellen, Überschichtung der Blotmembran mit MotE, Detektion mit anti-MotE Antikörper; Spuren: 1, Zellen ohne IPTG; 2, Zellen mit 0,3 mM IPTG induziert

Die Ergebnisse (Abb. 10) zeigen zweierlei. Erstens kann eine starke Bindung von MotC an MotE bzw. von MotE an MotC konstatiert werden. Zweitens treten bei der Auftrennung von MotE eine 18 kDa-Monomer- oder eine ca. 40 kDa-Dimerbande auf, je nachdem ob reduzierendes  $\beta$ -Mercaptoethanol dem Puffer zugesetzt war oder nicht. Das deutet darauf hin, daß unter oxidierenden Bedingungen MotE-Dimere über eine Cysteinbrücke stabilisiert werden. Dieser Aspekt wurde noch eingehend untersucht (4.2.10). MotC bindet offensichtlich mit gleicher Intensität an beide Formen von MotE. Das wesentliche Resultat dieses Experiments war die Erkenntnis, daß MotE und MotC in Wechselwirkung stehen. Folglich sollte der Einfluß von MotE auf MotC auf der (posttranslationalen) Ebene der reifen Proteine im Periplasma gesucht werden.

#### 4.1.8 Intrazelluläre Stöchiometrie von MotC und MotE

Die Mengen von MotC und MotE in Wildtyp-*S. meliloti* könnten die Stöchiometrie des MotC: MotE-Komplexes widerspiegeln. Sowohl MotC als auch MotE sind im Periplasma der *S. meliloti*-Zelle lokalisiert. MotE bindet sowohl als Monomer als auch als Dimer an MotC (Abb. 10) und übt vermutlich eine stabilisierende Funktion auf MotC aus. Für die Bestimmung der absoluten Proteinmengen wurden motile Wildtyp-Zellen gegen definierte MotC- bzw. MotE-Mengen auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und immunchemisch detektiert. Standards waren die rekombinanten Proteine MotC und MotE, deren Konzentrationen durch quantitative Aminosäureanalyse bestimmt wurden (3.9.2). Es wurden in der Regel Mengen von 0-3 ng Standardprotein gegen einen Hintergrund bestehend aus RU11/553-Zellextrakten ( $\Delta motE$ ) bei der MotE-Quantifizierung bzw. RU11/211-Zellextrakten ( $\Delta motC$ ) bei der MotC-Quantifizierung aufgetragen. Dadurch wurde gleiches Lauf- und Detektionsverhalten von rekombinant gereinigtem und zellulärem Protein gewährleistet.



**Abb. 11.** Repräsentative *Western blots* für die Quantifizierung von MotC und MotE in *S. meliloti*. Die eingesetzten Standard-Proteinmengen sind angegeben; Aufgetragen wurden Extrakte aus 1 ml motilen Zellen einer  $OD_{600}$  von 0,3. **A:** *Western blot* von Wildtyp-Zellextrakten mit gereinigtem MotC-Protein als Quantifizierungsstandard, anti-MotC Antikörper, Verdünnung 1:100; **B:** *Western blot* von Wildtyp-Zellextrakten mit gereinigtem MotE-Protein als Quantifizierungsstandard, anti-MotE Antikörper, Verdünnung 1:100

Nach Detektion mit gereinigten Antikörpern wurden die ECL-Filme digitalisiert. Die Ergebnisse der Auswertung der Filme mit dem *scion image* Programm, das Intensität und Fläche der Filmsignale integriert, sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

**Tab. 7.** Ergebnis der quantitativen *Western blot*-Analysen.

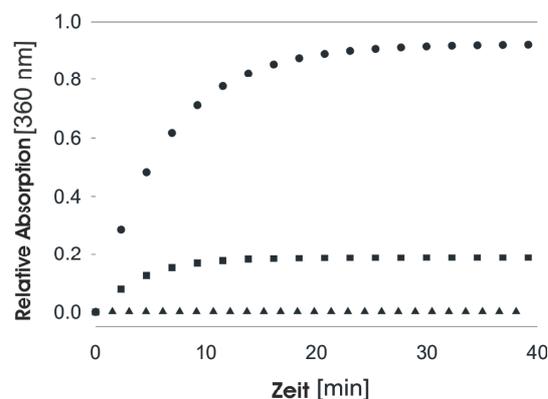
Experiment	ng MotE in RU11/001 <sup>1)</sup>	ng MotC in RU11/001 <sup>1)</sup>
1	1,09	1,81
2	1,26	1,53
3	1,88	1,45
4	0,80	1,97
5	----	1,80
6	----	1,65
Mittelwert	$1,31 \pm 0,67$	$1,70 \pm 0,2$
Molekülzahl / Zelle	$138 \pm 68$	$67 \pm 6,8$

<sup>1)</sup> Werte für 1 ml Zellen einer  $OD_{600} = 0,3$

Unter Verwendung der Zellzahl pro Ansatz von  $3,5 \times 10^8/\text{ml}$  bei einer  $\text{OD}_{600} = 0,3$ , der Avogadro-Konstante  $N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  und den molaren Massen von MotE und MotC (jeweils ohne Signalpeptid),  $\text{MW}_{\text{MotE}} = 16333,23 \text{ g/mol}$  und  $\text{MW}_{\text{MotC}} = 44050,68 \text{ g/mol}$  wurde die Anzahl der in einer Zelle vorhandenen MotE- und MotC-Moleküle berechnet (Formel siehe 3.11.6). Demnach existieren in einer Wildtypzelle  $138 \pm 68$  Moleküle MotE und  $67 \pm 7$  Moleküle MotC (Tab. 7). Dies entspricht einer 2:1 Stöchiometrie von MotE zu MotC, die eine Zusammensetzung des aktiven periplasmatischen Komplexes von  $(\text{MotE})_2\text{MotC}$  nahelegt.

#### 4.1.9 Aggregationshemmung von MotC durch MotE

Eine Deletion des *motE*-Gens resultierte in einer 70 %igen Reduktion von MotC (Tab. 5). *In vitro* wurde eine deutliche Wechselwirkung zwischen MotC und MotE nachgewiesen (4.1.7). Diese Resultate führten zu der Hypothese, daß MotE ein spezifisches Chaperon von MotC ist. Wie läßt sich diese Vorstellung belegen? Eine zentrale Funktion molekularer Chaperone besteht in der Aggregationshemmung nicht-nativer Proteine. Diese Eigenschaft diente hier als Kriterium für die Identifizierung von MotE als spezifisches Chaperon des MotC-Proteins. Eine unspezifische Aggregation von MotC wurde folglich mit einem Jasco V-550 Spektrophotometer über die Lichtstreuung bei 360 nm und 48°C während einer Zeitspanne von 40 min gemessen, und zwar mit und ohne MotE (3.15). Die resultierenden Kinetiken zeigt Abb. 12.



**Abb. 12.** Aggregationskinetiken von MotC in An- und Abwesenheit von MotE. MotC wurde in einer Endkonzentration von  $4,5 \mu\text{M}$  eingesetzt. Kreise: spontane Aggregation von MotC bei 48°C; Quadrate: MotC +  $1 \mu\text{M}$  MotE-Dimer; Dreiecke:  $1,5 \mu\text{M}$  MotE-Dimer.

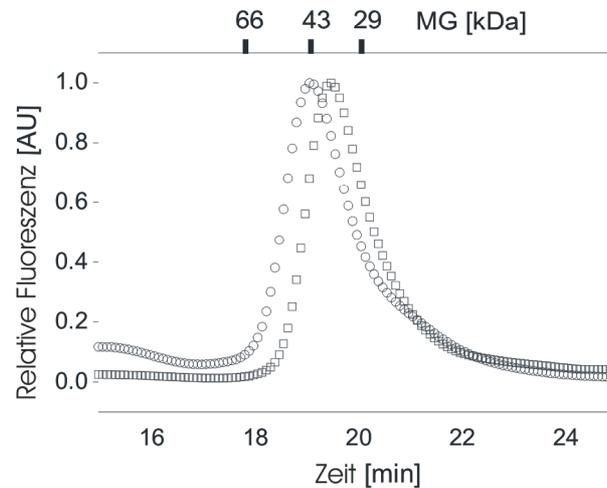
Bei 48°C aggregierte MotC spontan. Nach 5 min waren ca. 50 % aggregiert und nach 40 min war ein Plateau bei ca. 90 % Aggregation erreicht (Abb. 12, Kreise). Durch Zugabe von MotE wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der MotC-Aggregation erzielt. Ein molares MotE-Dimer und MotC Verhältnis von 1:4,5 resultierte in einer Aggregationsunterdrückung von 80 % (Abb. 12, Vierecke). Bei einem 1:3 Verhältnis konnte eine vollständige Aggregationsinhibierung festgestellt werden (Abb. 12, Dreiecke). Der Einsatz von BSA oder ImmunglobulinG als Aggregationshemmer hatte dagegen keinen Effekt (Daten nicht gezeigt). Ferner war MotE nicht in der Lage die Aggregation von typischen Chaperonsubstraten, wie Rhodanese oder Zitratsynthase (Mendoza *et al.*, 1992; Buchner *et al.*, 1998), zu verhindern. Daraus war zu schließen, daß MotE ein MotC-spezifisches Chaperon ist, das im Periplasma für die korrekte Faltung (und Zielführung) zuständig ist.

#### **4.1.10 MotE-Dimerisierung**

Die frühere Beobachtung von MotE-Dimeren bei einer Reinigung mittels Gelfiltration (Eggenhofer, 2001), der Befund der Affinitäts-*Western blot*-Analysen ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol-Zusatz (Abb. 10) und die gemessene 2:1 Stöchiometrie von MotE zu MotC (Tab. 7), sind deutliche Hinweise für eine spezifische MotE-Homodimerenbildung auch in der Zelle. Bei periplasmatischen Proteinen ist die Aktivierung durch Dimerbildung bekannt (Pugsley, 1993). Andererseits wurde im Affinitäts-*Western blot* (Abb. 10) beobachtet, daß sowohl Monomere als auch Dimere von MotE an MotC binden können. Im Folgenden sind daher biochemische, physiologische und molekulargenetische Experimente beschrieben, welche die Bedeutung und Funktion der MotE-Dimeren verständlich machen.

##### **4.1.10.1 Chromatographischer Nachweis der Dimerenbildung**

Durch Gelfiltrations-Chromatographie (GFC, *size exclusion*) sollte Klarheit über eine mögliche Oligomerisierung von MotC und MotE gewonnen werden. Die Molmassen der gelösten Makromoleküle wurden durch Vergleich mit Kalibrierstandards ermittelt. Es wurde eine TSK 4000 PW HPLC-Säule verwendet. Als Eichstandards dienten BSA (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa). Die Elutionsprofile von MotE und MotC sind in Abb. 13 dargestellt.



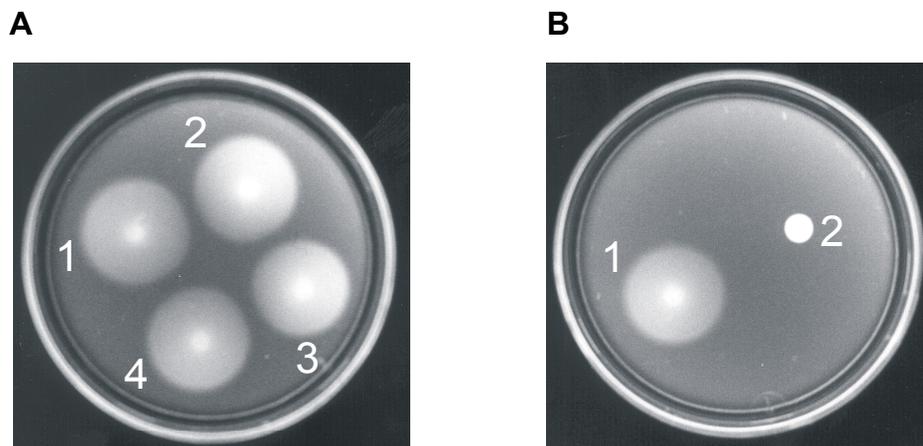
**Abb. 13.** Elutionsprofile von MotE und MotC nach Gelfiltrationschromatographie, Säule: TSK 4000 PW; Detektion erfolgte bei 300 nm nach Anregung bei 280 nm; oben sind die Molekulargewichte (MG) der Kalibrierungsproteine angegeben; Auftragsvolumen: 50  $\mu$ l; Proteinkonzentrationen: 0,5 mg/ml; Kreise: MotC, Quadrate: MotE. Die Signale wurden zum besseren Vergleich normalisiert.

Die Hauptfraktion von MotC eluierte nach 19 min entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 45.000. Dieser experimentell bestimmte Wert korreliert gut mit dem theoretischen MotC-Molekulargewicht von 44.051. Die Hauptfraktion von MotE eluierte nach 19,5 min, entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 33.000 Da. Dieser Wert korreliert mit dem zweifachen des theoretischen Molekulargewichtes von MotE (16.333 Da). Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß MotC als Monomer und MotE als Homodimeres im Periplasma vorliegen und bestätigten die Vermutung, daß die beiden Proteine (MotE)<sub>2</sub>MotC-Komplexe ausbilden.

#### 4.1.10.2 Stabilisierung des MotE-Dimers durch eine Cysteinbrücke

Die Dimerisierung zweier Monomere kann durch verschiedene schwache Wechselwirkungen oder kovalente Cysteinbrücken verursacht und stabilisiert werden. Im Fall von MotE kamen mindestens zwei Möglichkeiten in Betracht. Erstens existiert im MotE-Protein ein Leucinzipper-Motiv aus drei Leucinresten jeweils in einem Abstand von 7 Aminosäureresten (Abb. 6, L97, L104 und L111, rot markiert). Zweitens bot sich die Ausbildung einer Disulphidbrücke an, wobei die SH-Gruppen von zwei Cysteinresten

oxidiert und die Moleküle durch eine Disulphidgruppe (-S-S-) kovalent verbunden werden. MotE besitzt einen Cysteinrest an der Position 53 (Abb. 6). Deshalb wurden gezielte Austausche der Leucinreste nach Threonin und des Cysteinrestes nach Alanin eingeführt, um die Dimerisierungsstelle von MotE zu identifizieren. Die Austausche wurden durch *overlap extension* PCR (3.5.2) in *motE*-Gen eingeführt und über Konjugation und homologe Rekombination in *S. meliloti*-Wildtypzellen eingeführt (3.7). Nach Selektion auf das Rekombinationsereignis und Sequenzierung wurden die mutierten Stämme phänotypisch charakterisiert. Unter Annahme einer Aktivierung von MotE durch Dimerisierung sollte die Zerstörung des Dimerisierungsmotivs Auswirkungen auf die Motilität der Zellen haben.

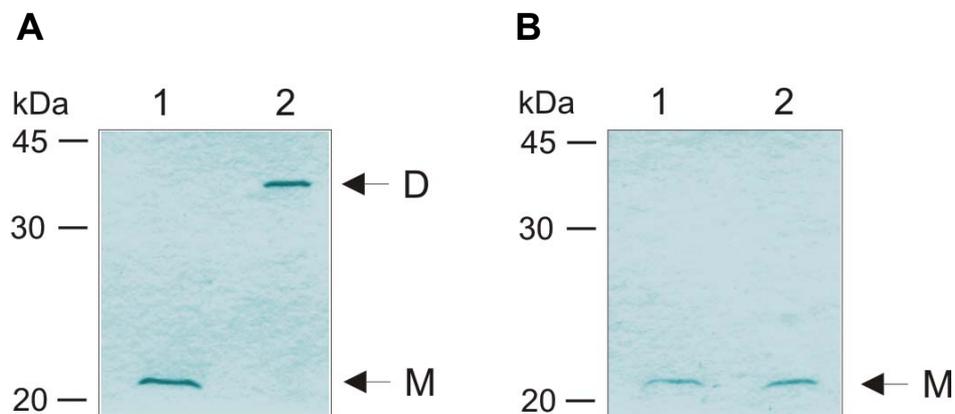


**Abb. 14.** Schwärmplatten-Analyse von *motE*-Mutantenstämmen. Es wurden jeweils 3  $\mu$ l von stationären *S. meliloti* TYC-Flüssigkulturen aufgetragen; **A:** Analyse der Leucinaustausche, 1: Wildtyp (RU11/001), 2: *motEL97T* (RU13/025), 3: *motEL104T* (RU13/026), 4: *motEL111T* (RU13/027); **B:** Analyse des Cysteinaustausches, 1: Wildtyp (RU11/001), 2: *motEC53A* (RU13/024).

Die Austausche der Leucinreste L97, L104, L111 nach Threonin und damit die Zerstörung des vermuteten Leucinzipper-Motivs hatten auf die Motilität von *S. meliloti* keinen Einfluß. Die Zellen zeigten ein normales Schwärmverhalten (Abb. 14, A). Dagegen erwiesen sich *S. meliloti* Zellen, deren Cys53-Rest durch Alanin ausgetauscht worden war, als immotil (Abb. 14, B), genauso wie MotE-defiziente Zellen. Der Cys53-Rest hat folglich eine essentielle Funktion für die Aktivierung des MotE-Proteins und ist möglicherweise der für die aktivierende Dimerisierung verantwortliche Aminosäurerest.

#### 4.1.10.3 Charakterisierung des MotE C53A-Mutantenproteins

Eine Affinitäts *Western blot*-Analyse (Abb. 10) hatte bereits gezeigt, daß MotE - abhängig von Oxidationszustand - als Monomer oder Dimer existiert. Beide Formen sind in der Lage, MotC-Protein zu binden. Die Vermutung, daß der Cys53-Rest für die Dimerisierung und Aktivität des Proteins zuständig ist, wurde durch den Schwärm-Defekt einer C53A-Mutante unterstrichen (Abb. 14). Zunächst war zu untersuchen, ob sich das rekombinante C53A-Protein auch *in vitro* wie ein Monomer verhält. Es wurde daher in der SDS-PAGE mit dem rekombinanten Wildtyp-Protein, jeweils mit und ohne reduzierendes Agens ( $\beta$ -Mercaptoethanol) analysiert.

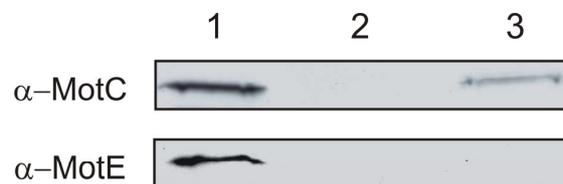


**Abb. 15.** SDS-PAGE von rekombinantem MotE und MotE C53A-Protein. 15%iges Polyacrylamidgel; es wurden jeweils 1,5  $\mu$ g Protein aufgetragen; Anfärbung mit *Coomassie brilliant blue*. Banden von MotE Monomer (M) und MotE Dimer (D) sind mit Pfeilen markiert. **A:** Auftrag des MotE WT-Proteins; **B:** Auftrag des MotE C53A-Proteins; Spuren: 1, ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol; 2, mit  $\beta$ -Mercaptoethanol.

Das Ergebnis in Abb. 15 besagt eindeutig, daß die C53A-Variante mit und ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol nur als Monomer existiert, während das Wildtyp-Protein ohne reduzierendes Agens erwartungsgemäß Dimere bildet. Der einzige Cys-Rest von MotE, Cys53, ist folglich für die Dimerisierung des Proteins verantwortlich.

#### 4.1.10.4 Warum ist MotE nur als Dimeres aktiv?

MotE-Monomere und -Dimere können MotC-Protein binden (Abb. 10), und vermutlich können beide Formen als Chaperon von MotC fungieren. Jedoch ist eine MotEC53A-Mutante von *S. meliloti* immotil (Abb. 14), d.h. das monomere MotE-Derivat kann seinen Beitrag zur MotC-Faltung und -Zielführung nicht leisten. Um dieses scheinbare Paradoxon zu lösen, wurden die MotC- und MotE-Proteinmengen in Wildtyp- und MotEC53A-Mutantenzell-extrakten immunchemisch verglichen. Die Vorgehensweise entsprach 4.1.3.



**Abb. 16.** *Western blot*-Analyse zur Überprüfung der Proteinstabilität von MotC und MotE C53A in *S. meliloti* Wildtyp und  $\Delta motE$ ; Verdünnung der Antikörper 1:100; Spuren: 1, Gesamtprotein aus RU11/001 (Wildtyp); 2, Gesamtprotein aus RU11/211 ( $\Delta motC$ , oben), bzw. RU11/553 ( $\Delta motE$ , unten); 3, Gesamtprotein aus RU13/024 (*motE* C53A).

*Western blot*-Analysen ergaben, daß der Zellextrakt der C53A-Mutante kein nachweisbares MotE-Protein und nur 33 % der Wildtyp-Menge an MotC-Protein enthielt. Dieser Wert resultierte aus der Mittelung von 14 unabhängig durchgeführten Messungen, dargestellt in Tab. 8.

**Tab. 8.** Quantifizierung des MotC Gehalts in RU13/024 (*motE* C53A)

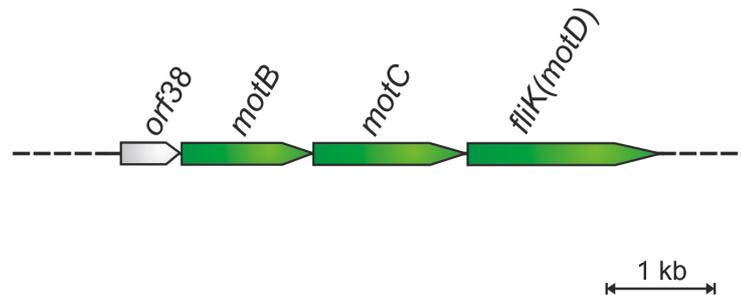
Stamm	RU11/001 (WT)	RU13/024 ( <i>motE</i> C53A) <sup>1)</sup>
Gehalt an MotC (in %)	100	33 ± 14

<sup>1)</sup> Wert ermittelt aus 14 unabhängigen *Western blot* Analysen, Auftrag jeweils 1 ml Zellen mit  $OD_{600} = 0,3$ .

Aus diesen Resultaten geht hervor, daß die Dimerisierung von MotE zur Stabilisierung des Chaperons (im Periplasma) erforderlich ist und daß nur ein über längere Zeit stabiles MotE-Dimeres in der Lage ist, seine Aufgabe als spezifisches Chaperon von MotC nachhaltig (d.h. in ausreichendem Maße) zu erfüllen. Monomeres MotE (auch die C53A-Variante) hat möglicherweise auch Chaperonpotential, zumindest kann auch MotEC53A noch an MotC binden (Daten nicht gezeigt), doch kann diese Form wegen seiner Instabilität keine ausreichenden Mengen korrekt gefaltetes MotC für die Motorfunktion generieren. MotC und MotB werden nämlich im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 gebraucht (Halbach, 2003).

## 4.2 MotD ist ein FliK-analoger Regulator der Länge des Flagellenhakens

Das *mot*-Operon von *S. meliloti* enthält vier Gene, *orf38*, *motB*, *motC* und *motD*, die alle einen essentiellen Beitrag zur Motilität der Bakterienzellen liefern (Platzer *et al.*, 1997; Sourjik *et al.*, 1998; Stöhr, 1999).



**Abb. 17.** Genkarte des *mot*-Operons von *S. meliloti*. Gene sind maßstabsgetreu durch farbige Boxen markiert, deren Polarität die Transkriptionsrichtung anzeigt. Grün markiert sind die Motilitätsgene, die weiße Box zeigt den offenen Leserahmen *orf* (*open reading frame*) 38, dessen Funktion noch nicht aufgeklärt ist.

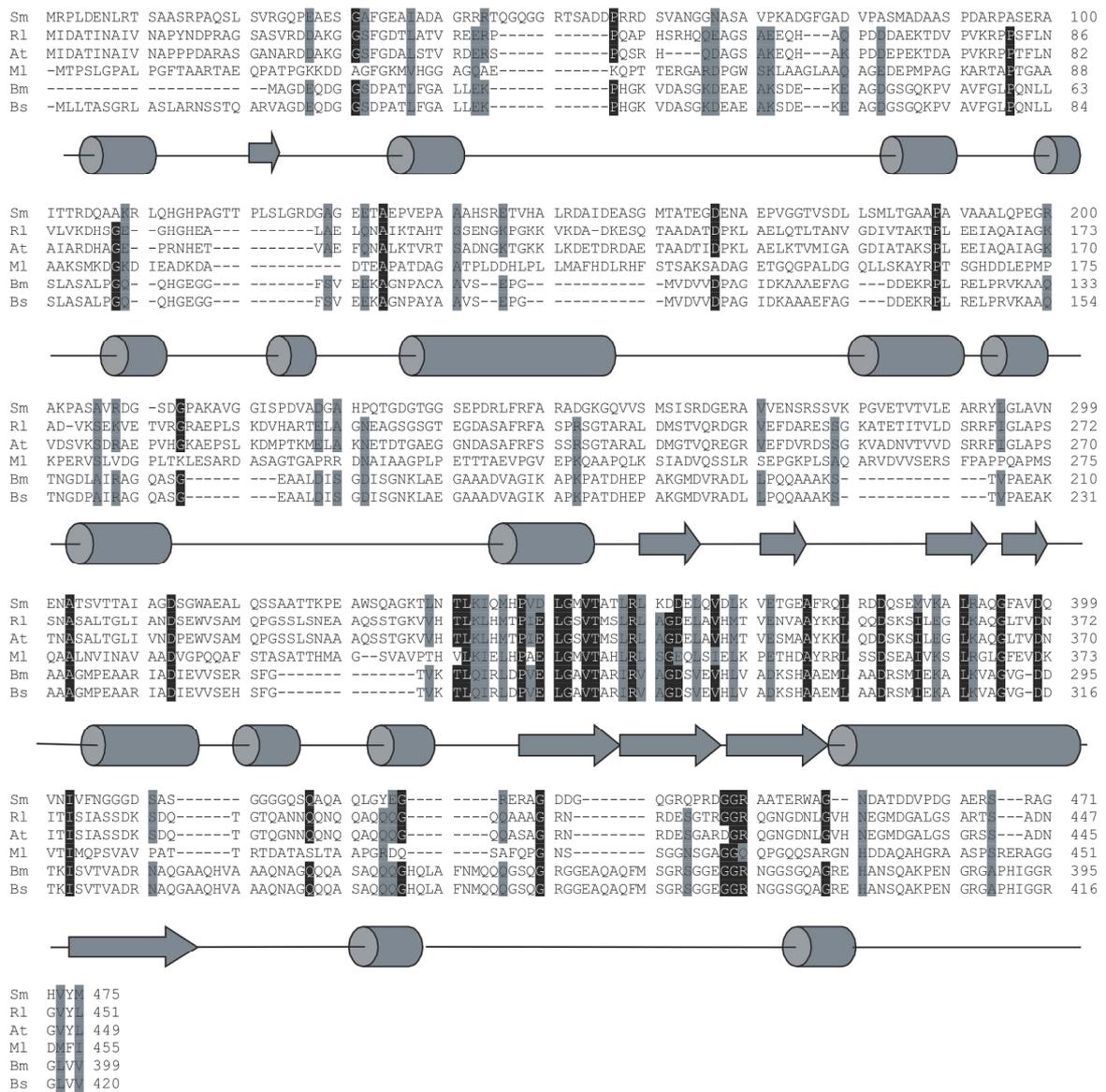
Inaktivierende Deletionsmutanten jedes dieser Gene resultieren in Unbeweglichkeit. Die Funktion der codierenden Proteine wurde aus den Mutanten-Phänotypen, Sequenzanalogien und biochemischen Tests abgeleitet. Orf38 ist ein positiver Regulator der Flagellensynthese, MotB ist Teil des Protonenkanals, MotC unterstützt als periplasmatische Komponente die MotB-Funktion (4.1) und MotD galt bisher als cytoplasmatische Motorkomponente zur Hochregulation der Flagellenrotation (Platzer *et al.*, 1997) und möglicher Antagonist des aktivierten Responsregulators, CheY2-P (Schmitt, 2002). Die Ergebnisse dieses Kapitels weisen MotD eine neue Rolle als Maßstab (*ruler*) für die Länge des Flagellenhakens zu mit Funktions- und entfernter Sequenzähnlichkeit mit dem *Salmonella*-Analogon von FliK. MotD wurde deshalb in FliK umbenannt.

### 4.2.1 Computergestützte Analyse der FliK-Sekundärstruktur

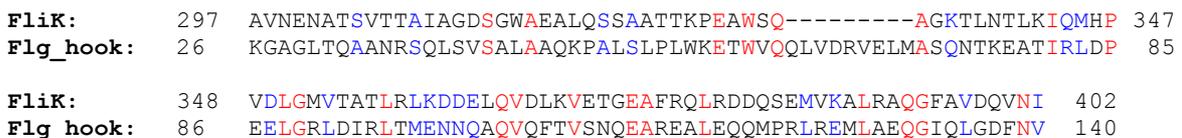
Das FliK (MotD)-Protein von *S. meliloti* hat nur ca. 10 % Identität und ca. 20 % Ähnlichkeit mit dem Orthologen FliK von *E. coli* bzw. *S. typhimurium* und wurde deshalb zunächst nicht als Funktionsanaloges erkannt (Platzer *et al.*, 1997). Der Unterschied beruht auf der hohen Varianz großer Teile des Proteins (Abb. 18) und vermutlich auf Unterschieden in Morphologie und Zusammensetzung zwischen den Haken komplexer und

glatter Flagellen (Raska *et al.*, 1976; Schmitt *et al.*, 1974). *S. meliloti*-typische FliK-Sequenzen wurden anschließend bei *Rhizobium lupini* und *Agrobacterium tumefaciens* identifiziert und sequenziert (Eggenhofer, 2001). Weitere FliK-Orthologe wurden durch Datenbanksuche bei drei weiteren  $\alpha$ -Proteobakterien identifiziert, nämlich: *Mesorhizobium loti*, *Brucella melitensis* und *Brucella suis*. Diese Organismen besitzen ebenfalls die neuartigen *motC*- und *motE*-Gene (4.1), die auch in analogen Operons arrangiert sind, was auf eine gemeinsame Evolution (und Funktionsbeziehung ?) der codierten Proteine hinweist. Ein Hydropathie-Plot (Kyte-Doolittle, 1982) zeigt, daß das FliK-Protein keine Transmembran-Helices aufweist, ferner keine Signalsequenz für eine Sekretion ins Periplasma enthält. Deshalb wurde vermutet, daß es sich bei FliK um ein cytoplasmatisches Protein handelt. Durch eine Analyse der FliK-Peptidsequenz mit dem Programm GLOBE (<http://cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein>) wurde FliK den nicht-globulären, elongierten Proteinen zugeordnet.

Die Primärstrukturen der sechs bekannten FliK-Vertreter werden in Abb. 18 verglichen; die vom Programm PSIPRED V2.3 prognostizierte Sekundärstruktur wurde kolinear zu den Sequenzen eingezeichnet. Diese weist ca. 25 %  $\alpha$ -Helixstrukturen, 15 %  $\beta$ -Faltblatt- und 60 % *random coil*-Bereiche auf. Die Primärsequenzen enthalten zwischen 399 (*Brucella melitensis*) und 475 (*S. meliloti*) Aminosäurereste. Gesamtähnlichkeit und -identität sind mit 30-40 % bzw. 20-30 % nicht außergewöhnlich, doch sticht der Bereich zwischen den *S. meliloti* Positionen 338 bis 403 durch deutlich höhere Ähnlichkeit (48 %) aller sechs Sequenzen heraus. In dieser Region identifizierte eine erneute Datenbanksuche (*MotifScanner*) ein konserviertes Sequenzmotiv, pfam02120.11, oder *Flg\_hook* genannt (Bateman *et al.*, 2004). Einen Vergleich der Konsensus-Sequenz (*Flg\_hook*) mit der FliK-Sequenz (Position 297-402) von *S. meliloti* zeigt Abb. 19; bei 20 % identischen Resten wurde eine Funktionsverwandtschaft dieser Regionen vermutet. Tatsächlich treten *Flg\_hook*-Motive in FliK-Analogen auf, welche die Länge des Flagellenhakens festlegen. Sie wurden zunächst bei *E. coli* und *Salmonella* identifiziert und ihre Bedeutung für die Flagellensynthese analysiert (Kawagishi *et al.*, 1996). Defektmutanten bilden sogenannte *polyhook*-Strukturen aus, Haken mit Überlänge, denen in der Regel (auf Grund fehlenden Flagellinexports) das Filament fehlt, und die somit in Unbeweglichkeit der Zellen resultieren. Die entdeckte Homologie war Anlaß, die Funktion des FliK-(früher MotD-)Proteins daraufhin zu analysieren, ob es sich hier um einen spezifischen Vertreter für Rhizobien (mit komplexen Flagellen) handelt, der ebenfalls die Länge der Flagellenhaken als *ruler* (Hirano *et al.*, 1994; Kawagishi *et al.*, 1996) bestimmt.



**Abb. 18.** Vergleich der abgeleiteten Peptidsequenzen von FliK von *S. meliloti* (Sm), *Rhizobium lupini* (Rl), *Agrobacterium tumefaciens* (At), *Mesorhizobium loti* (Ml), *Brucella melitensis* (Bm) und *Brucella suis* (Bs); grau bzw. schwarz hinterlegt: Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten zwischen fünf bzw. sechs Sequenzen; graue Zylinder:  $\alpha$ -Helices, Pfeile:  $\beta$ -Faltblattstrukturen, schwarze Linien: *random coil*.

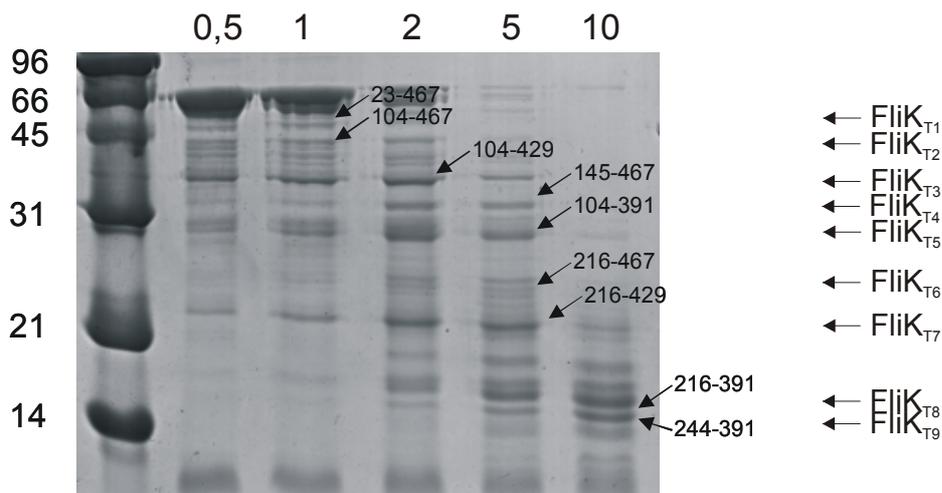


**Abb. 19.** Vergleich der abgeleiteten Peptidsequenz von FliK und der Konsensus-Sequenz des *Flg\_hook*-Motivs (pfam 02120.11). rot: identische Aminosäurereste; blau: ähnliche Aminosäurereste.

#### 4.2.2 Limitierte Proteolyse des FliK-Proteins

Die limitierte Proteolyse mit Trypsin ist eine etablierte Methode zur groben Kartierung von empfindlichen *linker*-Regionen in einem nativen Protein. Kompakte, globuläre Bereiche des Test-Proteins werden dabei langsamer abgebaut als elongierte Regionen. Eine limitierte Proteolyse des FliK-Proteins aus *Salmonella* mittels Trypsin (Spaltung hinter Arg oder Lys) resultierte in einem stabilen Fragment (Position 204-370), welches das *Flg\_hook*-Motiv enthält (Minamino *et al.*, 2004). Dieser konservierte Teil des Proteins ist globulär und ist daher für die Protease schlecht zugänglich.

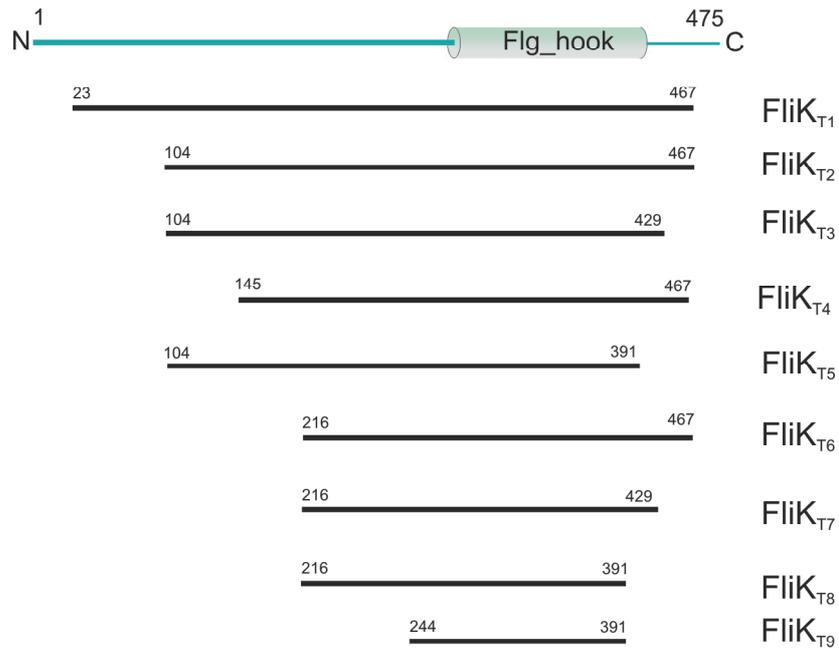
Hier wurde FliK mit Trypsin gespalten und der zeitliche Verlauf der Fragmentierung elektrophoretisch registriert. Metastabile und stabile Banden wurden zur Feststellung der Fragmentgrößen mit einem *Bruker Biflex* MALDI-TOF-Massenpektrometer von Dr. M. Haslbeck (TU München, Lehrstuhl für Biotechnologie) analysiert.



**Abb. 20.** Limitierte Proteolyse des FliK-Proteins. Es wurden 30 µg FliK mit 0,25 U Trypsin verdaut. Proben wurden zu den angegebenen Zeiten (0,5-10 min) entnommen und auf das 15 %ige SDS-Gel aufgetragen. Die markierten Banden (AS-Positionen) wurden anhand der Fragmentgröße zugeordnet, Größe der Standard-Proteine (in kDa) ist links angegeben.

Abb. 20 zeigt die Kinetik der Fragmentierung von FliK durch Trypsin. Es wurden sieben metastabile (FliK<sub>T1</sub>, FliK<sub>T2</sub>, FliK<sub>T3</sub>, FliK<sub>T4</sub>, FliK<sub>T5</sub>, FliK<sub>T6</sub> und FliK<sub>T7</sub>) und zwei stabile Fragmente (FliK<sub>T8</sub>, FliK<sub>T9</sub>) erhalten. Metastabile Fragmente sind nach 10 min vollständig abgebaut. Die nach dieser Proteolysezeit stabilen Fragmente, FliK<sub>T8</sub> und FliK<sub>T9</sub>, wurden durch massenspektrometrische Analyse als FliK(216-391) bzw. FliK(244-391)

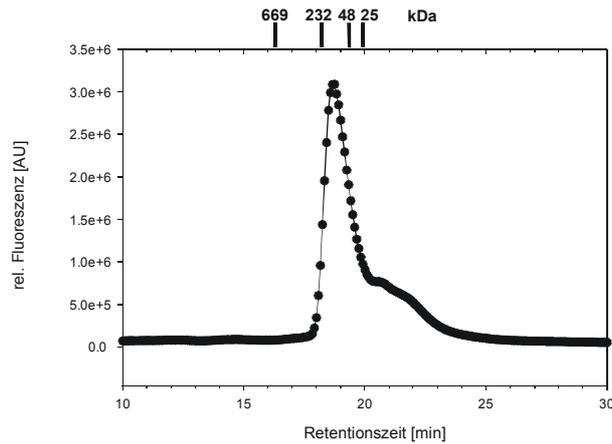
identifiziert. Diese Fragmentierungen sind in der Sequenz ihrer Generierung in Abb. 21 unter der linearen Karte von FliK aufgereiht. Sie indiziert im N-terminalen Bereich fünf und im C-terminalen Bereich drei Trypsin-empfindliche Stellen, die durch die Positionen der betroffenen Peptidbindungen markiert sind. Die stabilen Fragmente, FliK<sub>T8</sub> und FliK<sub>T9</sub>, enthalten den Kernbereich des *Flg\_hook*-Motivs (Abb. 19), das offensichtlich in einer globulären Domäne liegt.



**Abb. 21.** Sequentielle Zuordnung von FliK-Fragmenten, die durch limitierte Trypsin-Proteolyse generiert wurden (Daten aus Abb. 20).

### 4.2.3 Monomer oder Oligomer?

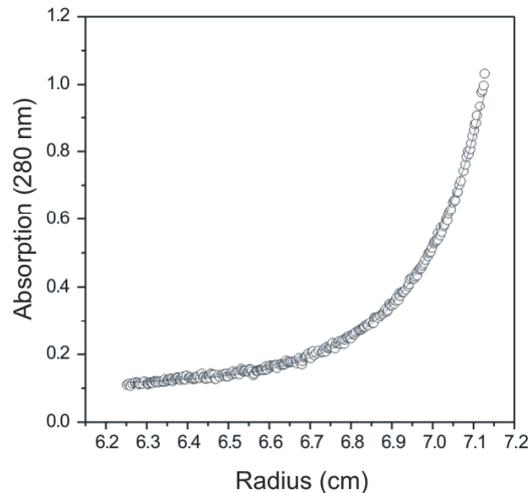
Eine mögliche Oligomerisierung des rekombinanten FliK-Proteins wurde mit zwei Methoden -Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation- überprüft (mit freundlicher Unterstützung von M. Haslbeck, TU-München). Die Gelfiltration von FliK mittels TSK 4000 PW HPLC ergab eine Hauptfraktion mit einer Retention von 19 min (Abb. 22) entsprechend einer Molekularmasse von 150.000.



**Abb. 22.** Elutionsprofil von rekombinantem FliK nach Gelfiltrationschromatographie. Oben angegeben: Größe der Kalibrierungsproteine, 669 kDa, Thyroglobulin; 232 kDa, Katalase, 48 kDa, Ovalbumin; 25 kDa, Chymotrypsin.

Das FliK-Monomer hat eine errechnete Molekularmasse von 48.839. Die Gelfiltrationsdaten würden folglich für eine Trimeres FliK sprechen. Es könnte aber auch sein, daß das FliK unspezifische Aggregate bildet, zumal das Elutionsprofil (Abb. 22) eine ausgeprägte Schulter zu längeren Retentionszeiten, entsprechend FliK-Dimeren und Monomeren, aufweist. Eine andere Erklärung ist die Tatsache, daß elongierte Proteine, wie das FliK-Protein von *Salmonella*, erfahrungsgemäß zu kürzeren Retentionszeiten tendieren (Minamino *et al.*, 2004).

Deshalb wurde das Problem der FliK-Konfiguration unabhängig mittels analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Die analytische Sedimentations-Gleichgewichtszentrifugation ist eine Variante der klassischen Sedimentations-Geschwindigkeitszentrifugation. Bei ersterer werden die Winkelgeschwindigkeiten der Zentrifuge so niedrig gewählt, das Diffusion und Sedimentation eines Testmoleküls sich die Waage halten. In das resultierende (gemessene) Konzentrationsprofil geht dann als einziger Parameter das effektive Molekulargewicht ein. Gereinigtes FliK-Protein wurde mit einer Konzentration von 0,4 mg/ml in Dialysepuffer (2.5.5) eingesetzt und die Sedimentations-Gleichgewichtszentrifugation in einer Beckman XL-I analytischen Ultrazentrifuge (Ti-60 Rotor, 13.000 Upm, Detektion bei 280 nm) durchgeführt. Der Sedimentation wirkt die Diffusion immer stärker entgegen, so daß eine Spezies im Gleichgewicht ein exponentielles Konzentrationsprofil innerhalb der Meßzelle ausbildet. Gemessen wird die Absorption bei 280 nm, als Funktion des Radius (Abb. 23).



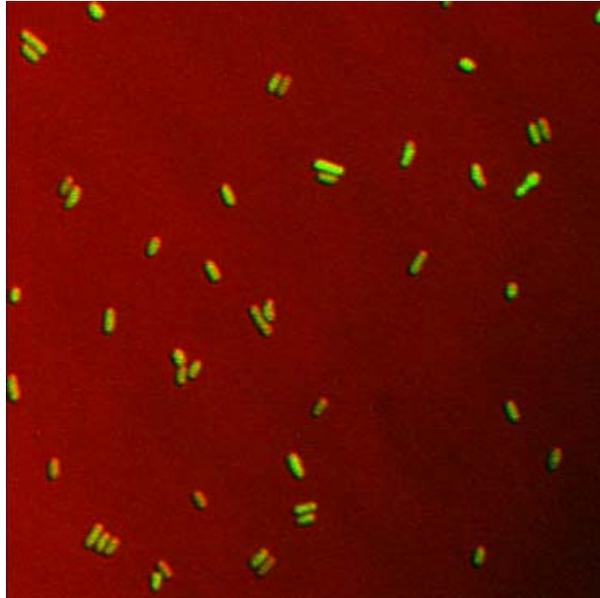
**Abb. 23.** Sedimentations-Gleichgewichtszentrifugation des FliK-Proteins. Der Gleichgewichtslauf wurde bei 13.000 Upm in einer Beckman XL-I analytischen Ultrazentrifuge (Ti-60 Rotor) bei 20°C durchgeführt. FliK wurde in einer Konzentration von 0,4 mg/ml in Dialysepuffer (2.5.5) eingesetzt.

Die Berechnung der Molekularmasse nach der Boltzmann-Gleichung (3.13) ergab einen Wert von  $50.047 \pm 1500$ , was dem Wert eines FliK-Monomeren entspricht. Es ist denkbar, daß die elongierte Konformation der N- und C-terminalen Bereiche (Analyse der Sekundärstruktur, 4.2.1 und limitierte Proteolyse, 4.2.2) von FliK zu fehlerhaften Retentionszeiten bei der Gelfiltration führte und/oder Grund für die Ausbildung unspezifischer *in vitro* Aggregate ist. Man darf jedoch davon ausgehen, daß natives FliK als Monomer vorliegt.

#### 4.2.4 Lokalisierung von FliK

Die Lokalisierung von Proteinen in der Bakterienzelle mittels Fluoreszenzmikroskopie und über Zellfraktionierung eröffnet häufig den Zugang zu seiner Funktion. FliK besitzt kein Signalpeptid und wurde folglich im Cytoplasma vermutet. Auch liegen keine größeren hydrophoben Bereiche vor (Platzer, 1996), die auf eine Membranassoziiierung schließen lassen. Es ist jedoch gut denkbar, daß es an die cytoplasmatische Oberfläche des Flagellenmotors assoziiert ist. Für Fluoreszenzanalysen wurden zwei Konstrukte von FliK mit N-terminaler Fusion von EGFP hergestellt, eines im Überexpressionsvektor pBBR1-MCSII (2.1), das andere als chromosomale Insertion (3.18) in den *fliK*-Genloкус. S.

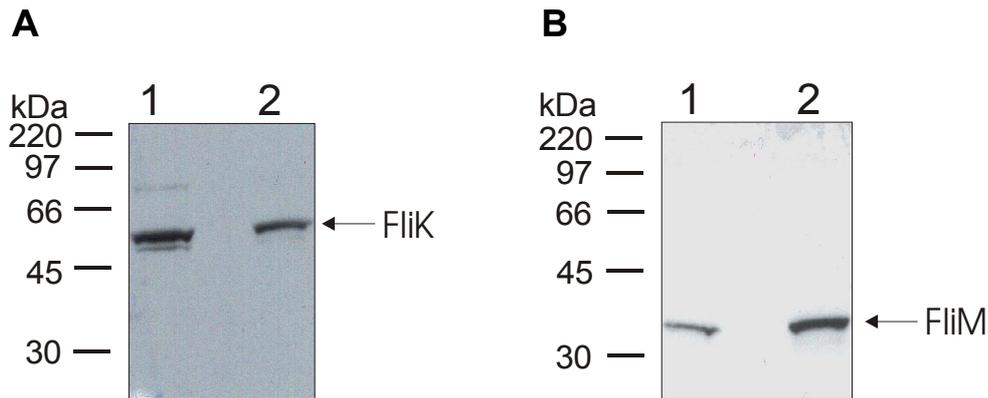
*meliloti*-Zellen mit diesen Konstrukten wurden bis zur Motilität angezogen (3.1.2) und nach Ansicht im konfokalen *laser scanning*-Mikroskop (3.18) beurteilt.



**Abb. 24.** Lokalisierung von FliK-EGFP in  $\Delta fliK$ -*S. meliloti*-Zellen, komplementiert mit *fliK*-EGFP (exprimiert vom Plasmid pRU2874). Das repräsentative Fluoreszenzbild wurde mit einem Zeiss LSM 510 konfokalen *Laser-scanning* Mikroskop aufgenommen (Vergrößerung:100-fach).

Es stellte sich heraus, daß sowohl bei Überexpression von FliK-EGFP, aber auch bei schwacher Expression des Fusionsproteins unter dem natürlichen Promotor die Fluoreszenz das gesamte Zellvolumen füllte, ohne Hinweise auf eine polare oder laterale Lokalisation des Proteins zu geben (Abb. 24). Entweder ist FliK gleichmäßig im Cytoplasma verteilt, oder seine (teilweise) Kompartimentierung ist mittels GFP-Fluoreszenz nicht zu detektieren.

Deshalb wurde in einem weiteren Experiment immunologisch nach FliK in getrennten Zellfraktionen gesucht. Motile *S. meliloti*-Wildtypzellen wurden mittels French-Press-Passage aufgeschlossen und der Extrakt durch differentielle Zentrifugation in lösliche (Überstand) und unlösliche Fraktion (Membranen) getrennt. Mit gereinigtem anti-FliK-Antikörper wurde FliK in den Fraktionen detektiert. Erfahrungsgemäß können durch zu starke Scherkräfte beim Zellaufschluß assoziierte Proteine von der Membran abgetrennt werden und erscheinen so in der löslichen Fraktion. Daher wurden als Kontrolle gereinigte anti-FliM-Antikörper eingesetzt, weil FliM-Protein als Bestandteil des C-Rings mit dem Flagellenmotor Teil der Membranfraktion ist.



**Abb. 25.** *Western blot*-Analyse zur Identifizierung von FliK (A) und FliM (B) in der löslichen und der Membranfraktion von *S. meliloti*-Wildtyp-Zellen. 10 %ige SDS-Polyacrylamidgele, Aufgetragen wurde der Extrakt von 20 ml motilen *S. meliloti*-Zellen einer  $OD_{600}$  von 0,3. **A:** Detektion mit anti-FliK-Antikörper (1:100); **B:** Detektion mit anti-FliM-Antikörper (1:100); Spuren: 1, gesamtlösliche Fraktion; 2, Membranfraktion

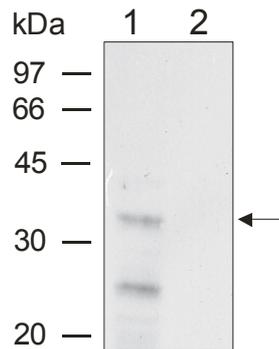
Der anti-FliK-Antikörper wies eine starke Bande in der löslichen Fraktion nach (Abb. 25 A, Spur 1) und eine schwächere Bande in der Membranfraktion im Verhältnis 60:40 (Abb. 25 A, Spur 2). Der anti-FliM Antikörper detektierte FliM sowohl in der löslichen (Abb. 25 B, Spur 1) als auch in der Membranfraktion (Abb. 25 B, Spur 2). Das Verhältnis der Banden betrug ca. 40:60. Ein Vergleich der Abb. 25 A und Abb. 25 B zeigt graduelle Unterschiede in der Membranständigkeit von FliK und FliM, die aber auch technisch bedingt sein könnten. Wesentliche Anteile von FliK (und FliM) sind nach diesen Daten jedoch membranständig, und es kann spekuliert werden, daß FliK (wie FliM) an den C-Ring des Flagellenmotors assoziiert ist.

## 4.2.5 Wechselwirkung von FliK und FliM

### 4.2.5.1 Affinitätschromatographie

Wenn nach den Ergebnissen der Zellfraktionierung (4.2.4) FliK (teilweise) an den Flagellenmotor „angedockt“ ist, müßten Bindungs-Partner unter bekannten Motorkomponenten gesucht werden. Dieses Ziel wurden hier mit zwei immunologischen Methoden, Affinitätschromatographie und Affinitäts-*Western blot*-Analyse, verfolgt. In einer früheren Arbeit (Eggenhofer, 2001) wurde bereits eine Wechselwirkung von FliK mit einem 35 kDa Protein festgestellt. Diese Bande entspricht exakt dem Molekulargewicht des FliM-Monomeren. Da jetzt auch gereinigter anti-FliM-Antikörper zur Verfügung

stand, wurde die Affinitätschromatographie wiederholt und zwar mit Extrakten von Wildtypzellen und  $\Delta fliM$ -Zellen. Diese Extrakte wurden an einer FliK-*HiTrap*-Säule (3.14) chromatographiert, gewaschen und die gebundenen Komponenten durch Absenkung des pH-Wertes eluiert. Die Eluate beider Zellextrakte wurden auf einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel getrennt und elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Zur Detektion wurden affinitätsgereinigte FliM-Antikörper eingesetzt.

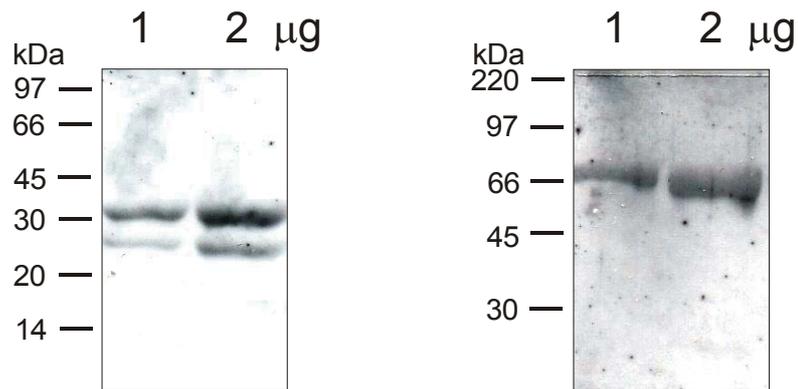


**Abb. 26.** *Western blot*-Analyse von Elutionsfraktionen einer Affinitätschromatographie an einer FliK-*HiTrap*-Säule mit anti-FliM Antikörpers (Verdünnung 1:100); 10%iges SDS-Polyacrylamidgel, FliM Bande mit einem Pfeil markiert. Aufgetragen wurden TCA-gefällte Elutionen nach Affinitätschromatographie mit gesamtlöslicher Fraktion aus *S. meliloti* Wildtyp-Zellen (Spur 1), *S. meliloti*  $\Delta fliM$ -Zellen (Spur 2).

Im Eluat der Affinitätschromatographie von *S. meliloti* Wildtyp-Zellextrakten konnte mittels anti-FliM-Antikörper zwei Banden von 35 kDa und 25 kDa detektiert werden (Abb. 26, Spur 1). Die größere Bande entspricht der früher bereits entdeckten 35 kDa-Bande (Eggenhofer, 2001). Bei der kleineren Bande dürfte es sich um ein FliM-Abbauprodukt handeln. Im Eluat der  $\Delta fliM$ -Zellextrakte (Abb. 26, Spur 2) zeigte sich keine mit anti-FliM detektierbare Bande. Damit wurde FliM als Bindungspartner von FliK bestätigt.

#### 4.2.5.2 Affinitäts-*Western blot*

Mittels Affinitäts-*Western blot* kann eine Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen auf einer *blotting*-Membran festgestellt werden. Im vorliegenden Fall wurden FliM- und FliK-*blotting*-Membranen wechselseitig mit dem vermuteten Bindungspartner überschichtet und nach gründlichem Waschen mit Antikörper gegen das überschichtete Protein detektiert (3.11.6).



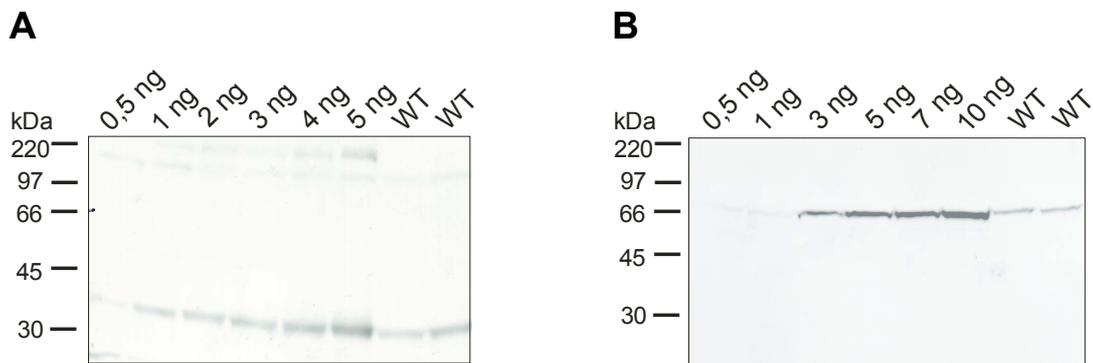
**Abb. 27.** Affinitäts-*Western blot* von FliK und FliM. Aufgetragen wurden jeweils 1 bzw. 2  $\mu\text{g}$  rekombinant exprimierte und gereinigte Proteine; **A:** Auftrag von FliM, Überschichtung der *blotting*-Membran mit 2  $\mu\text{g/ml}$  FliK, Detektion mit anti-FliK (1:100), **B:** Auftrag von FliK, Überschichtung der *blotting*-Membran mit 2  $\mu\text{g/ml}$  FliM, Detektion mit anti-FliM (1:100).

Die FliM-*blotting*-Membran mit FliK-Protein überschichtet und mit anti-FliK-Antikörper geprüft (Abb. 27, A), zeigte eine deutliche FliM-Bande bei ca. 35 kDa und eine schwächere Bande bei ca. 25 kDa, möglicherweise das zuvor (Abb. 26) detektierte Abbauprodukt. Bei doppelter Auftragsmenge von FliM sind beide Signale noch deutlicher. Im reziproken Experiment wurde die FliK-*blotting*-Membran mit FliM-Protein überschichtet und mit FliM-Antikörper detektiert. Auch in diesem Fall trat bei einfacher und doppelter Proteinmenge eine FliK-Bande auf (Abb. 27, B). Diese Daten bestätigen die Bindung von FliK und FliM und sind ein starker Hinweis auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten.

#### 4.2.6 Intrazelluläre Stöchiometrie von FliK zu FliM

Die stöchiometrischen Verhältnisse von FliK und FliM in *S. meliloti*-Zellen konnten Hinweise auf einen möglichen FliK-FliM-Komplex liefern. Mittels quantitativer *Western blot*-Analysen sollten Kenntnisse über die in einer *S. meliloti*-Zelle vorhandene Anzahl von FliK und FliM-Molekülen gewonnen werden. Dazu wurden wieder Extrakte von motilen *S. meliloti*-Wildtyp-Zellen und bekannte FliK- bzw. FliM-Mengen durch SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Als Referenz dienen die rekombinanten, gereinigten FliK- und FliM-Proteine, deren Konzentrationen mittels Aminosäureanalyse quantifiziert worden waren (3.9.2). In der Regel wurden bis zu 7 ng der Referenz verwendet, die zusammen mit Extrakten von RU11/800-Zellen ( $\Delta\text{fliM}$ ) als

Hintergrund für die FliM-Quantifizierung, bzw. RU11/212 ( $\Delta$ fliK) als Hintergrund für die FliK-Quantifizierung aufgetragen wurden. Dieser Hintergrund gewährleistet gleiche Bedingungen für die elektrophoretische Trennung der reinen Referenzproteine und der Wildtyp-Zellextrakte.



**Abb. 28.** Repräsentative *Western blot*-Analysen zur Quantifizierung von FliM und FliK. Die eingesetzten Standard-Proteinmengen sind oben angegeben; Aufgetragen wurden Extrakte aus je 1 ml motil-angezogenen Zellen einer  $OD_{600}$  von 0,3; **A:** *Western blot* von Wildtyp-Zellextrakten mit gereinigtem FliM-Protein als Quantifizierungsstandard, anti-FliM Antikörper, Verdünnung: 1:100; **B:** *Western blot* von Wildtyp-Zellextrakten mit gereinigtem FliK-Protein als Quantifizierungsstandard, anti-FliK-Antikörper, Verdünnung: 1:100.

Nach Detektion mit den spezifischen Antikörpern wurden die Signale digitalisiert. Die Auswertung aus vier bis sechs unabhängigen Experimenten mit dem *scion image* Programm, das Intensität und Fläche der Signale integriert, ergab die in Tab. 9 zusammengefassten Proteinmengen.

**Tab. 9.** Ergebnisse der quantitativen *Western blots* zur Stöchiometrie-Ermittlung von FliM und FliK

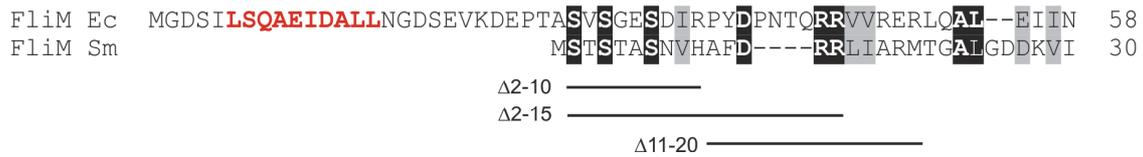
Versuch	ng FliM in RU11/001 <sup>1)</sup>	ng FliK in RU11/001 <sup>1)</sup>
1	2,7	1,8
2	3,2	1,5
3	3,3	1,3
4	5,7	1,9
5	----	2,9
6	----	3,2
Mittelwert	3,7 ± 1,4	2,1 ± 0,8
Molekülzahl / Zelle	187 ± 66	74 ± 28

<sup>1)</sup> Werte für 1 ml Zellen der OD<sub>600</sub> = 0,3

Unter Verwendung der Zellzahl pro Ansatz von  $3,5 \times 10^8$ /ml bei einer OD<sub>600</sub> = 0,3, der Avogadro-Konstante  $N_A = 6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$  und den molaren Massen von FliM und FliK,  $MW_{\text{FliM}} = 34.020 \text{ g/mol}$  und  $MW_{\text{FliK}} = 48.842 \text{ g/mol}$  wurde die Anzahl der in einer Zelle vorhandenen FliK- und FliM-Moleküle mit der unter 3.11.6 angegebenen Formel berechnet. Demnach liegen in einer Wildtypzelle  $74 \pm 28$  Moleküle FliK und  $187 \pm 66$  Moleküle FliM (Tab. 9) vor. Dies entspricht einer ca. 1:2 Stöchiometrie von FliK zu FliM.

#### 4.2.7 Einfluß von *fliK*- und *fliM*-Deletion auf Motilität und Flagellensynthese

Die nachgewiesene Wechselwirkung FliK und FliM (4.2.5) könnte auf einer Lokalisierung von FliK am C-Ring der Flagellen beruhen. Die 40 %ige Membranständigkeit (4.2.4) und die FliK:FliM 1:2 Stöchiometrie (4.2.6) sind weitere Hinweise auf eine (zeitweise) Assoziation von FliK an den C-Ring des Flagellenmotors. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob sich Mutanten von FliK und FliM gegenseitig beeinflussen bzw. die Flagellensynthese beeinträchtigen. Deletionsmutanten von *fliK* und *fliM* sowie drei 5'-terminale Teildeletionen von *fliM* wurden hier auf Schwärmfähigkeit und ihren Einfluß auf Proteinstabilität und -synthese von FliK, FliM und FlaA getestet.



**Abb. 29.** Vergleich der N-terminalen FliM-Peptidsequenzen von *E. coli* (Ec) und *S. meliloti* (Sm). Rot: Bindestelle des aktivierten Responsregulators CheY-P, schwarz bzw. grau hinterlegt: Sequenzidentitäten und Ähnlichkeiten; Die Längen von drei *fliM*-Teildeletionen sind durch Linien markiert.

Ein Vergleich der N-terminalen FliM-Peptidsequenzen von *E. coli* und *S. meliloti* lässt erkennen, daß *S. meliloti* ein um 26 AS-Reste verkürztes FliM besitzt, das die *E. coli*-CheY-P Bindestelle nicht enthält (Abb. 29, rot markiert). Der *S. meliloti*-Responsregulator CheY2-P muß deshalb weiter downstream binden, ebenso FliK. Das Fehlen der CheY2-Bindung sollte sich durch den Ausfall der Chemokinesis bemerkbar machen, Fehlen der FliK-Bindung sollte den Export von Flagellin und folglich die Motilität blockieren. Deshalb wurden Schwärmfähigkeit und freie Schwimmgeschwindigkeit (ohne und mit Lockstoff) von diesen Mutanten gemessen. Die Ergebnisse faßt Tab. 10 zusammen.

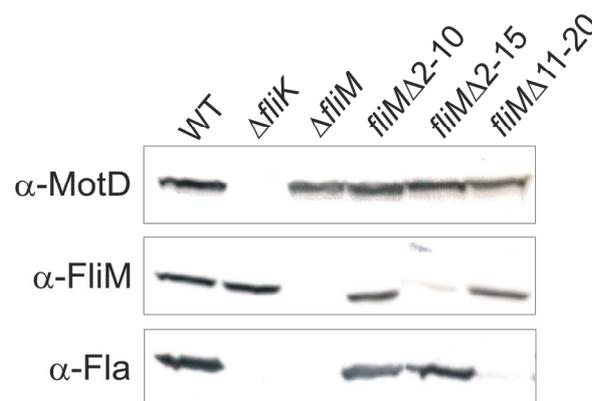
**Tab.10.** Schwärmfähigkeit und Schwimmgeschwindigkeiten von *fliK*- und *fliM*-Deletionsmutanten.

Stamm	Mutation	Schwärmradius (% WT)	Schwimmgeschwindigkeit (µm/s) <sup>1)</sup>		
			- Pro	+ Pro	Rel. Beschl.
RU11/001	Wildtyp	100	37,7	40,6	7,8
RU11/212	Δ <i>fliK</i>	0	immotil	immotil	---
RU11/800	Δ <i>fliM</i>	0	immotil	immotil	---
RU11/845	Δ2-10	89	42,2	45,6	8,0
RU11/861	Δ2-15	76	36,3	37,4	3,1
RU11/846	Δ11-20	0-10	immotil	immotil	---

<sup>1)</sup> Mittlere Schwimmgeschwindigkeit. Durchschnittswerte von 1000 einzelnen gemessenen Bakterienspuren wurden in jeder Probe durch computergestützte Bewegungsanalyse bestimmt und für mindestens fünf unabhängige Zellpopulationen gemittelt. Jede Geschwindigkeitsmessung wurde zusätzlich in Anwesenheit von 10<sup>-2</sup> M Prolin als Lockstoff durchgeführt.

Deletionen der gesamten *fliK*- bzw. *fliM*-Gene resultierten erwartungsgemäß im vollständigen Fehlen von Schwärm- und Schwimmgeschwindigkeit. Dagegen weisen die drei Teildeletionen von *fliM* ein differenziertes Bild auf: Interessanterweise wurden Zellen mit der Δ2-10 Deletion um 12 % schneller ohne Verlust der Chemokinese, während die Δ2-15

Deletion zu einer geringen (4 %igen) Verlangsamung und einer Reduktion der Chemokinese auf 3 % führten. Sehr wahrscheinlich bindet das rotations-verlangsamende CheY2-P im Bereich der FliM AS-Reste 2-15, aber auf eine komplexe Weise, die weiter zu untersuchen ist. Die Deletion  $\Delta 11-20$  resultiert dagegen eindeutig in unbeweglichen Zellen, d.h., jenseits des AS-Restes 15 ist der Flagellinexport und vermutlich die Bindung von FliK betroffen. Dieses Konzept wurde in einer nachfolgenden *Western blot*-Analyse direkt überprüft.



**Abb. 30.** *Western blot*-Analyse von  $\Delta fliK$ ,  $\Delta fliM$ , sowie *fliM*-Teildeletionsstämmen. Verwendet wurden polyklonale Antikörper, wie links angegeben, Verdünnung jeweils 1:100, für Flagellinantikörper 1:500. Aufgetragen wurde jeweils Gesamtprotein aus 1 ml motilen Zellen einer  $OD_{600}$  von 0,3 der angegebenen Stämme.

Extrakte von Wildtyp und Zellen der fünf Deletionsstämmen (Tab. 10) wurden in *Western blot*-Analysen auf das Vorhandensein und die Stabilität von FliK, FliM und FlaA (Flagellin) hin untersucht. Die Ergebnisse der Abb. 30 führten zu den folgenden Schlußfolgerungen.

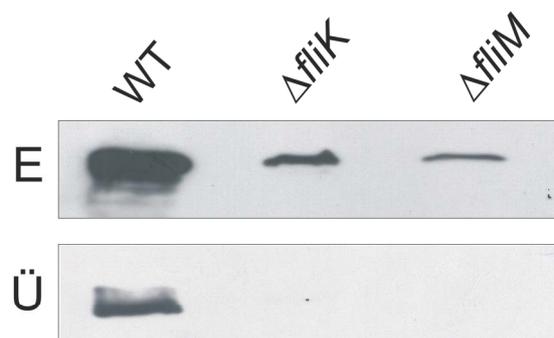
- Deletion von *fliK* und *fliM* beeinflussen nicht die Stabilität des Partnerproteins, aber die *fliM* $\Delta 2-15$  Deletion destabilisiert das codierte FliM-Restprotein.
- Die Deletionen  $\Delta fliK$  und  $\Delta fliM$  sowie die Teildeletion *fliM* $\Delta 11-20$  reduzieren drastisch die Flagellin (FlaA)-Menge.

Es wurde postuliert, daß letzteres auf einer Blockade des Flagellinexports und einer *feedback* Repression der Flagellinsynthese beruht. Fehlende Flagelline in der  $\Delta fliK$ -Mutante waren auch Anlaß dafür, das *fliK*-Gen bzw. dessen Produkt, FliK, neu zu klassifizieren. Die vormals postulierte Funktion als beschleunigende Motorkomponente

MotD (Platzer *et al.*, 1997) mußte nach der Beobachtung des fehlenden Flagellins in einer  $\Delta fliK$ -Mutante korrigiert werden. Die vermutete Rolle von FliK als Längenmaßstab für den Flagellenhaken (und die Blockade des Flagellinexports in einer  $fliK$ -Deletionsmutante) werden im Folgenden experimentell bewiesen.

#### 4.2.8 Export von Flagellinen in der $\Delta fliK$ -Mutante

Das Fehlen von Flagellin in FliK-defizienten Zellen (Abb. 30) warf ein völlig neues Licht auf die Funktionen des FliK-Proteins. Da kein  $Mot^-$ , sondern ein  $Fla^-$ -Phänotyp vorlag war eine Rolle beim Aufbau der Geißel bzw. beim Export des Flagellins wahrscheinlich. Es ist bekannt, daß FliM neben der Übertragung von Signalen der His-Autokinase eine zentrale Funktion bei der Ausbildung eines funktionierenden Exportkanals hat (Mathews *et al.*, 1998). Deshalb wurde hier untersucht, ob auch FliK direkt oder indirekt am Export von Flagellin beteiligt ist. Dazu wurden Zellextrakte und Zellkulturüberstände von Wildtyp,  $\Delta fliK$ - und  $\Delta fliM$ -Zellen immunchemisch analysiert. Die Zellkulturüberstände von motilen *S. meliloti*-Zellen wurden vor dem Auftrag steriltfiltriert (0,2  $\mu m$  Porengröße), um abgescherte Flagellen abzutrennen.



**Abb. 31.** *Western blot*-Analyse von *S. meliloti* Zellextrakten (E) und Zellkulturüberständen (Ü) auf Vorhandensein von Flagellin. Verdünnung des Flagellinantikörpers 1:500. Aufgetragen wurden Zellextrakte und Zellkulturüberstände aus jeweils 3 ml Zellen der angegebenen Stämme der  $OD_{600}$  von 0,3.

Die Daten von Abb. 31 ergaben eindeutig, daß in beiden Deletionsmutanten,  $\Delta fliK$  und  $\Delta fliM$ , noch geringe Flagellinmengen in den Zellen (ca. 5 % - 10 % der WT-Mengen)

vorliegen, jedoch kein Flagellin nach außen transportiert wird. Das unterstreicht die Beteiligung beider Komponenten am Flagellinexport.

#### 4.2.9 Transkription des *flaA*-Gens in einer $\Delta$ *fliK*-Mutante

Nicht nur im externen Medium, sondern in Extrakten FliK-defizienter *S. meliloti*-Zellen wurde eine starke Reduktion von Flagellin nachgewiesen werden. Dieser Effekt kann entweder durch Reduktion der Transkription von *flaA* (Promotoraktivität) oder durch schnellen Abbau synthetisierten Flagellins in der  $\Delta$ *fliK*-Mutante zustande kommen. Deshalb wurde der *flaA*-Promotor an ein Reporter-gen (*lacZ*) ligiert und die Aktivität in Wildtyp und  $\Delta$ *fliK*- bzw.  $\Delta$ *fliM*-Mutantenzellen bestimmt (3.8).

Tab. 11. Aktivität des *flaA*-Promotors<sup>1)</sup>

Stamm	RU11/001 (WT)	RU11/212 ( $\Delta$ <i>fliK</i> )	RU11/800 ( $\Delta$ <i>fliM</i> )
$\beta$ -Galaktosidase-Aktivität <sup>1)</sup> (Miller Units)	4373 $\pm$ 336	1264 $\pm$ 34	976 $\pm$ 41
% WT-Aktivität	100	29	22

<sup>1)</sup> $\beta$ -Galactosidaseaktivität nach Miller (1972) wurde aus je fünf unabhängigen Experimenten bestimmt.

Die in Tab. 11 zusammengefaßten Ergebnisse der *flaA*-Promotoraktivität demonstrieren, daß die Transkription von *flaA* und nicht die Stabilität der Flagellin-Monomere in FliK- und FliM-defizienten Zellen auf 29 % bzw. 22 % reduziert wurde. In Analogie zum *E. coli*-System wurde daraus gefolgert, daß die Blockade des Flagellinexports auch einen (bei *S. meliloti* noch nicht identifizierten) anti-Sigmafaktor betrifft, der den Sigmafaktor für die *flaA*-Transkription solange blockiert, bis der Export frei ist (Scharf *et al.*, 2001). Auch dieses Experiment zeigte den Zusammenhang von FliK und Flagellinexport. Wird FliK (in Analogie zu FliK aus *Salmonella*) auch auf diesem Wege exportiert?

#### 4.2.10 Export von FliK

Jüngere Untersuchungen des FliK-Proteins von *Salmonella* zeigten, daß auch FliK selbst exportiert wird (Minamino *et al.*, 1999). Falls das *S. meliloti* Protein sich entsprechend verhalten würde, wäre dies ein weiterer Hinweis auf seine Funktion als FliK-Analogon. Western blot-Analysen mit anti-FliK-Antikörper von Zellextrakt und -Überstand von Wildtyp-,  $\Delta fliK$ - und  $\Delta fliF$ -Zellen sollten darüber Aufschluß geben.



**Abb. 32.** Western blot-Analyse von FliK in *S. meliloti* Zellextrakt (E) und Zellkulturüberstand (Ü); Verdünnung des FliK-Antikörpers 1:100; Aufgetragen wurden Zellextrakt, bzw. Zellkulturüberstand aus 3 ml Zellen der angegebenen Stämme der OD<sub>600</sub> von 0,3.

Die in Abb. 21 dargestellten Daten bestätigten den vermuteten Export von FliK in doppelter Weise: Einerseits trat FliK im zellexternen Überstand auf (Spur WT, unten), andererseits fehlte es dort bei der  $\Delta fliF$ -Deletionsmutante, welcher der MS-Ring des Flagellenmotors und damit ein wesentlicher Teil des Exportkanals der Flagelle fehlt. Es zeigte sich auch, daß die Menge von FliK durch die  $\Delta fliF$ -Mutation (anders als Flagellin) nicht reduziert wurde (Spur  $\Delta fliF$ , oben), seine Transkription folglich ungehindert durch die Exportblockade abläuft.

#### 4.2.11 *flhB*-Suppressormutanten von $\Delta$ *fliK*-Mutanten

Bei *S. typhimurium* stehen FliK und FlhB in Wechselwirkung. FlhB ist ein integrales Membranprotein, mit vier Transmembran-Domänen und einer C-terminalen cytoplasmatischen Domäne, die als Anker für FliK dient (Minamino *et al.*, 2004). Man vermutet, daß FliK diese Verankerung benötigt, um sich wie eine elastische Feder entlang des Geißelhakens strecken zu können, um dessen Länge als Maßstab (*ruler*) festzulegen. Läßt sich diese Vorstellung auf das FliK-FlhB-System von *S. meliloti* übertragen? Eine *fliK*-Deletionsmutante exportiert praktisch kein Flagellin und produziert *polyhooks*, wie für *S. meliloti* noch gezeigt wird (4.2.12). Gibt es, wie bei *Salmonella* (Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996) Suppressormutanten im *flhB*-Gen, sog. *phf* (*polyhook filament*) - Mutanten, die in der Lage sind, den Ausfall von FliK (teilweise) zu kompensieren und wieder intakte Flagellen zu bilden? Dieser Frage wurde im Folgenden mit der Selektion von schwärmfähigen  $\Delta$ *fliK*-Suppressormutanten nachgegangen. Es gibt zwei Klassen von *phf*-Mutanten: intragenische (in *fliK*, bei *fliK*-Mutanten) und intergenische Suppressoren (in *flhB*, bei *fliK*-Mutanten und *fliK*-Totaldeletion). Der molekulare Charakter von intragenischen Suppressoren ist bislang noch unverstanden. Alle bekannten intergenischen Suppressoren finden sich bei *Salmonella* in *flhB* (Kutsukake *et al.*, 1994, Williams *et al.*, 1996). Bei  $\Delta$ *fliK*-Zellen von *S. meliloti* wurden im Lichtmikroskop einzelne motile Zellen (ca. 0,1 – 1 %) in der ansonsten immotilen Population beobachtet, und auch bei elektronenmikroskopischer Untersuchung von Flagellenpräparationen von  $\Delta$ *fliK*-Zellen sind *phf*-Mutanten aufgetreten (4.2.12). Dies hat wahrscheinlich zu der falschen Klassifizierung von  $\Delta$ *fliK* als „ $\Delta$ *motD*“ geführt (Platzer *et al.*, 1997), also Mutanten mit paralysiertem, aber begeißeltem Phänotyp.

##### 4.2.11.1 Isolierung von $\Delta$ *fliK*-Suppressormutanten

Zur Selektion von Suppressormutanten wurden 3  $\mu$ l einer stationären  $\Delta$ *fliK*-*S. meliloti*-Zellkultur auf Schwärm-Agarplatten (2.4.2) aufpipettiert und drei Tage bei 30°C inkubiert (3.20). FliK-defiziente Zellen sind immotil und bilden in dieser Zeit kompakte Kolonien auf Schwärmplatten aus. Wenn diese 10-15 Tage in einer Kammer mit ausreichend Luftfeuchtigkeit bei 30°C inkubiert wurden, zeigte sich gelegentlich ein lokaler Schwarm, der seitlich von der Kolonie immotiler Zellen ausging.

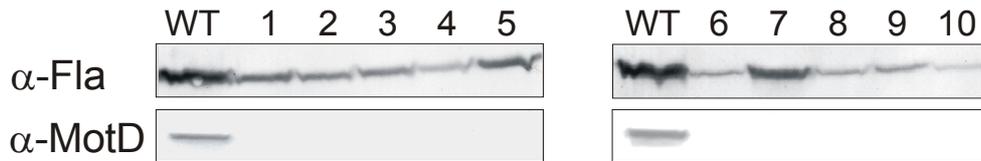


**Abb. 33.** Schwärmplatte von  $\Delta fliK$ -Zellen mit einem asymmetrischen Schwärmhof einer Suppressormutante (Pfeil) nach 10 Tagen Inkubation bei 30°C. Angeimpft wurde mit 3  $\mu$ l einer stationären RU11/212 ( $\Delta fliK$ )-Kultur.

Abb. 33 zeigt eine Schwärmplatte mit  $\Delta fliK$ -Zellen nach 10 Tagen Inkubation. Der Pfeil markiert den neuen Schwärmhof motiler Zellen, der von der Kolonie immotiler Zellen seitlich auswächst. Auf insgesamt 60 Selektionsplatten entstanden in 10 Fällen Schwärmhöfe. Daraus wurden Zellen vereinzelt und molekular und physiologisch analysiert.

#### 4.2.11.2 Charakterisierung der Suppressormutanten

Zunächst galt es auszuschließen, daß es sich bei den isolierten schwärmfähigen Zellen lediglich um Wildtyp-Kontaminationen handelte. Eine *Western blot*-Analyse mit gereinigtem anti-FliK-Antikörper sollte das Fehlen von FliK nachweisen. Gleichzeitig sollte mit anti-Fla-Antikörper demonstriert werden, daß diese Zellen Flagellen-Filamente ausgebildet. Mittels des *scion image*- Programms wurden die detektierten Flagellinmengen quantifiziert.



**Abb. 34.** *Western blot*-Analyse von Extrakten unabhängig isolierter schwärmfähigen Zellen (Abb. 33). Aufgetragen wurden Zellextrakte von 1 ml Zellen der OD<sub>600</sub> von 0,3; Verwendete Antikörper wie links angegeben, Verdünnungen:  $\alpha$ -FliK, 1:100,  $\alpha$ -Fla: 1:500; Spuren: 1-10 Mutanten, sowie WT-Kontrollen.

Aus den *Western blot*-Analysen aller zehn Mutanten (Abb. 34) ging hervor, daß alle Flagellin produzierten, aber kein FliK-Protein enthielten. Damit waren die Merkmale von Suppressormutanten des  $\Delta$ *fliK*-Typs erfüllt. Ihre Schwärmfähigkeit und ihre Flagellinproduktion waren unterschiedlich, aber in allen Fällen weitaus geringer als beim Wildtyp (Tab. 12).

**Tab. 12.** Charakterisierung der *flhB*-Suppressormutanten von  $\Delta$ *fliK*.

Suppressor-mutante	relativer Schwärmring-durchmesser (%WT)	relativer Flagellinhalt (%WT)	<i>flhB</i> -Mutation (Nukleotid-position)	Resultierender AS-Austausch (AS-Position)	Entsprechender AS-Austausch bei <i>Salmonella</i>
1	28	63	G898A	A300T	A298T
2	26	48	C899T	A300V	A298V
3	28	53	G898A	A300T	A298T
4	21	40	G884A	G295E	G293R
5	32	58	T967C	S323P	
6	25	30	C833T	A278V	
7 <sup>1)</sup>	49	59	----	----	
8	23	29	T1035C	L345P	
9	23	29	G899T	A300V	A298V
10	17	28	C958T	L320F	

<sup>1)</sup> Bei dieser Mutante konnte das *flhB*-Gen nicht amplifiziert werden. Möglicherweise lag die Mutation in der Bindestelle des verwendeten *flhB*-internen Primers.

Alle zehn Mutanten wurden auf die zugrunde liegende *phf*-Mutation hin untersucht. In Analogie zu den Ergebnissen bei *Salmonella* (Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996) ging ich davon aus, daß die Suppressor-Mutationen im *flhB*-Gen zu suchen seien. Mittels PCR-Amplifikation von *flhB* und Sequenzanalyse wurden in neun von zehn Fällen singuläre Substitutionen identifiziert, in einem Fall war die Mutation aus technischen Gründen nicht zu lokalisieren (Tab. 12). Von fünf Mutanten sind analoge Substitutionen

im *flhB*-Gen von *Salmonella* bekannt (Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996), ein Befund der ihre Interpretation als Suppressor von FliK zusätzlich stützt. Als *hotspot* erwies sich Ala300, dessen Substitution durch Thr oder Val insgesamt viermal auftrat (Tab. 12). Ala300 und Gly295 sind hochkonservierte Reste im *flhB*-Gen (siehe Anhang). Möglicherweise markieren sie Positionen, die mit FliK in Wechselwirkung treten. Diese Ergebnisse, vor allem die deutlichen Analogien zum *Salmonella*-System (Kutsukake *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1996), sind der stärkste Beweis für die postulierte FlhB-FliK-Wechselwirkung beim Export und der Längendetermination des Flagellenhakens.

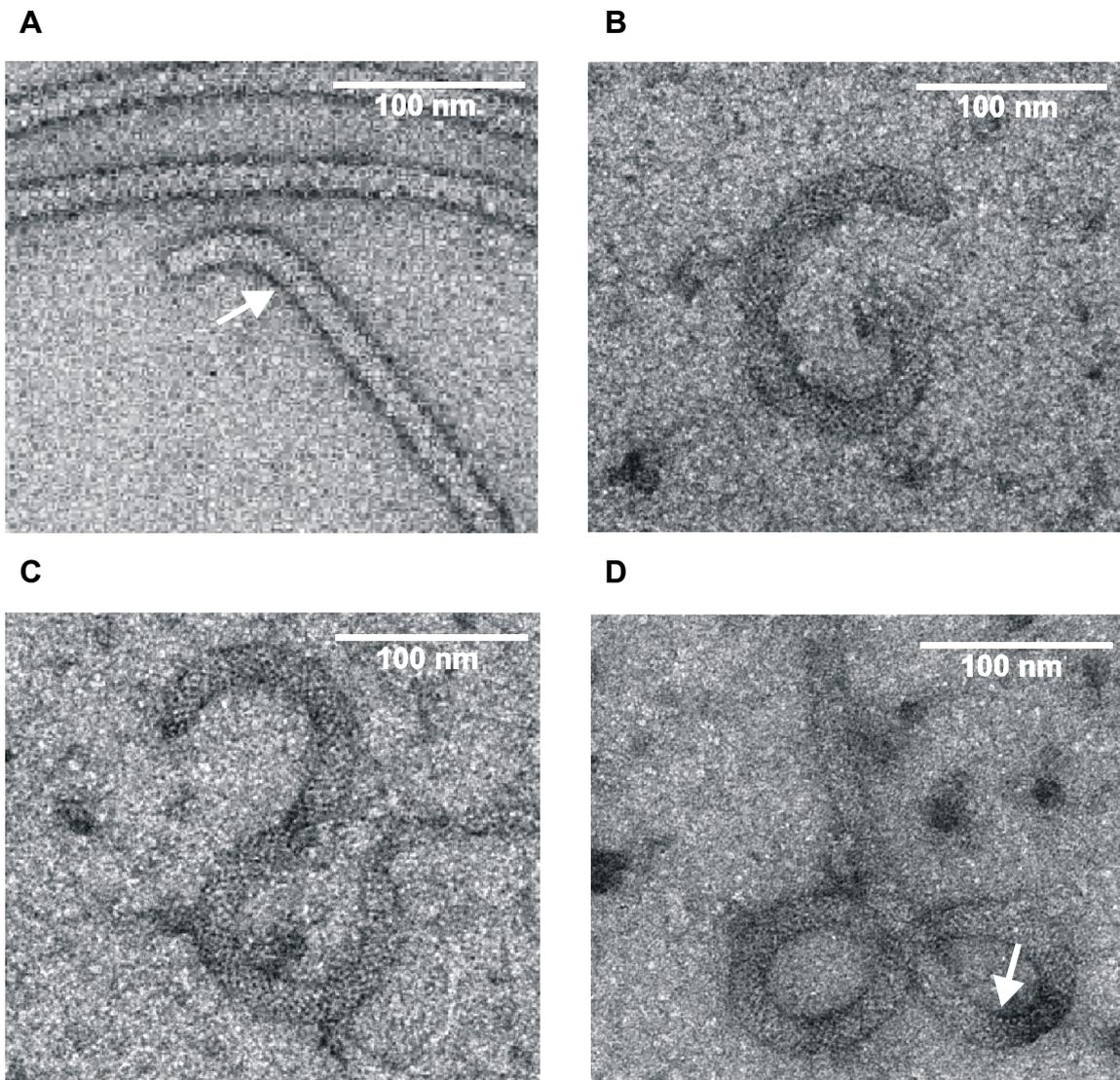
## 4.2.12 Elektronenmikroskopie

### 4.2.12.1 $\Delta$ *fliK*-Mutante

Als letzter, direkter Beweis für die FliK-Funktion als Längenmaß für den Haken dienten elektronenmikroskopische Aufnahmen von  $\Delta$ *fliK*- und Suppressormutanten (4.2.11). In beiden Fällen wären Flagellenhaken ungewöhnlicher Form und Länge zu erwarten (*polyhooks*). Die Haken von Wildtyp-Flagellen sind  $55 \pm 5$  nm lang. FliK-defiziente *Salmonella*-Zellen zeigen Haken der Länge 40-900 nm (Kawagishi *et al.*, 1996; Patterson-Delafield *et al.*, 1973; Suzuki & Iino, 1981). Hier wurden Flagellenpräparate der *fliK*-Deletionsmutante (RU11/212) hergestellt (3.17) und nach Negativkontrastierung anhand elektronenmikroskopischer Bilder ausgewertet (Aufnahmen: R. Rachel, Universität Regensburg, Lehrstuhl für Mikrobiologie).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Flagellenpräparaten des Wildtyps und der *fliK*-Deletionsmutante zeigen deutliche Unterschiede: Die Wildtyp-Haken sind proximal um ca.  $75^\circ$  gebogen und haben eine einheitliche Länge von  $55 \pm 5$  nm. Der Übergang in die komplexe Struktur des Filaments ist anhand der verschiedenen Oberflächenmuster klar erkennbar (Abb. 35, A, Pfeil). Die  $\Delta$ *fliK*-Präparate (Abb. 35, B,C) weisen dagegen deutliche *polyhook*-Strukturen mit Längen bis zu 500 nm auf; am distalen Ende ist kein komplexes Filament erkennbar. Allerdings kommt es in seltenen Fällen auch zur Filamentbildung an *polyhook*-Strukturen, wie Abb.35, D dokumentiert. Dies ist eine regelmäßige Beobachtung bei den schwach motilen Suppressormutanten, deren elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild abschließend untersucht wurde. Der hier

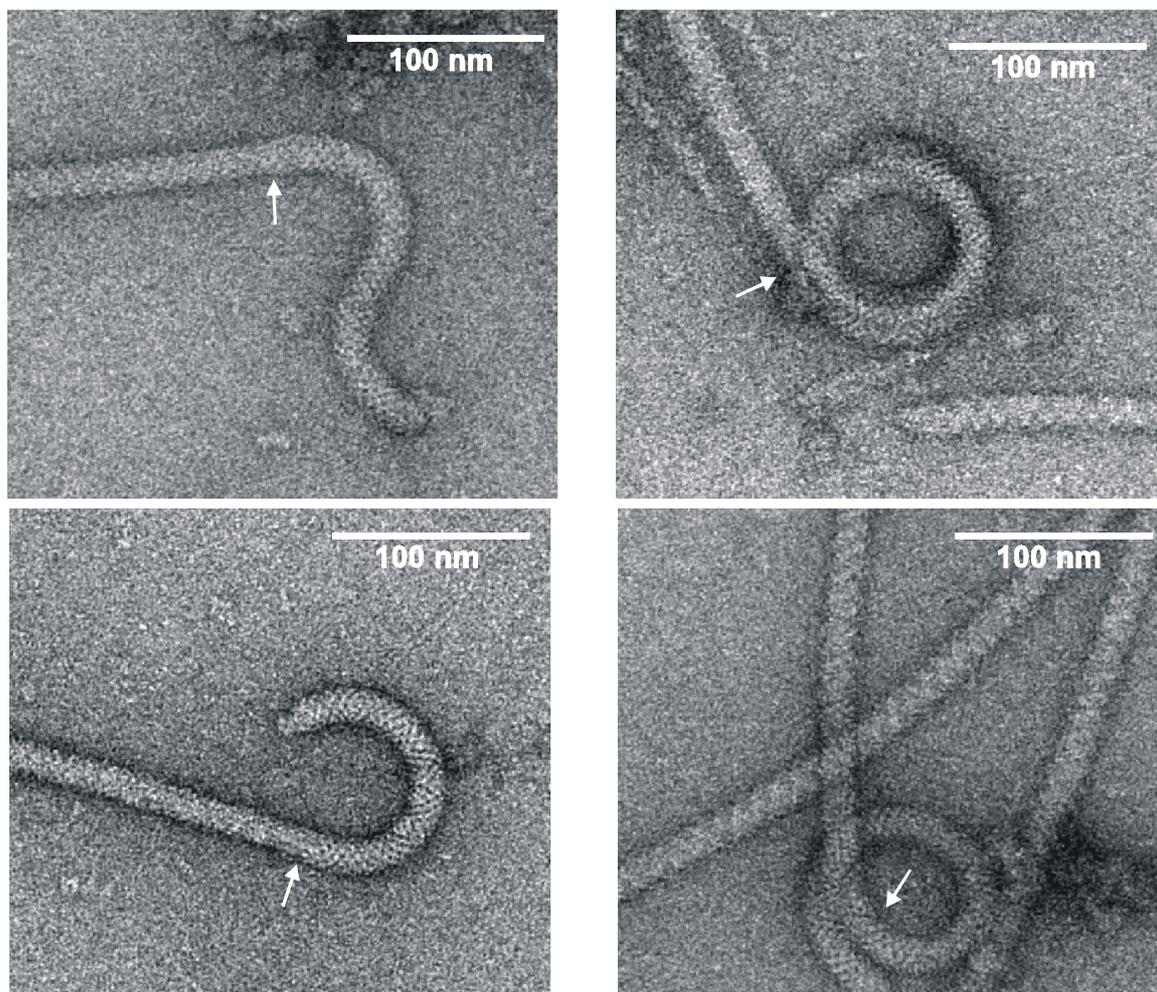
beschriebene Aspekt von *polyhooks* als Folge einer *fliK*-Deletion ist der bisher stärkste Beweis für die FliK-Funktion als Längenmaßstab für den Flagellenhaken.



**Abb. 35.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Flagellenpräparaten von RU11/001 (Wildtyp) und RU11/212 ( $\Delta fliK$ ). Negativkontrastierung mit 3 % Uranylacetat, Vergrößerung: 28.000-fach, Pfeile kennzeichnen den Haken-Filament-Übergang; **A**, RU11/001; **B**, **C**, RU11/212, *polyhooks*; **D**, RU11/212, *polyhooks* mit Filament.

#### 4.2.12.2 *phf*-Suppressormutante des *fliK*-Deletionsstammes

Die isolierten extragenischen Suppressormutanten im *flhB*-Gen (Tab. 12) sind wieder motil und erreichen eine relative Schwärmfähigkeit bis zu 30 % des Wildtyps. Durch immunchemische Analyse der Mutanten-Zellextrakte wurden bis zu 50 % der Flagellinmenge des Wildtyps detektiert (Tab. 12). Dies sprach für die Assemblierung von Flagellen-Filamenten trotz Abwesenheit von FliK. In folgendem Experiment wurde die Feinstruktur von Haken- und Filament der *phf*-Mutanten aufgeklärt. Dazu wurde von der Suppressormutante 1 (FlhB A300T) eine Flagellenpräparation (3.17) durchgeführt. Die erhaltene Probe wurde elektronenmikroskopisch untersucht.



**Abb. 36.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Flagellenpräparaten der *phf*-Suppressormutante 1 (Tab. 12). Negativkontrastierung mit 3 % Uranylacetat, Vergrößerung: 28.000-fach, Pfeile kennzeichnen den Haken-Filament-Übergang.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser *phf*-Suppressormutante (Abb. 36) zeigen, daß die Hakenstrukturen im Vergleich zum Wildtyp verlängert und stärker

gekrümmt sind und eine Art von *polyhook* darstellen. An deren distalem Ende sind komplexe Filamente zu erkennen, welche die Motilität der Mutante erklären. Ein normales Schwärmverhalten ist auf Grund der *polyhooks* nicht möglich, denn diese verhindern die notwendige korrekte Bündelung der Flagellen als Voraussetzung für geradlinige Läufe (Williams *et al.*, 1996). Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die *phf*-Suppressormutation im *flhB*-Gen zwar den FliK-Defekt in der Filamentassemblierung, nicht aber den Defekt in der Hakenlängen-Regulierung supprimieren kann. Dies legt den Schluß nahe, daß die Kontrolle der Hakenlänge und die Assemblierung des Filaments zwei getrennte Vorgänge sind.

## 5. Diskussion

Das Bodenbakterium *S. meliloti* unterscheidet sich in mehreren molekularen Details von Chemotaxis und Bewegung radikal von den gründlich erforschten Enterobakterien *E. coli* und *S. typhimurium* (Macnab, 1996). Der phylogenetische Abstand von über 500 Millionen Jahren (Ochman & Wilson, 1987) und die unterschiedlichen Biotope sind die wahrscheinlichste Ursache für die Evolution von unterschiedlichen Mechanismen und Strukturen im sensorischen System. Dazu zählen die komplexe Feinstruktur der Geißel (Krupski *et al.*, 1983; Trachtenberg *et al.*, 1985), die einsinnige cw-Rotation der Bakteriengeißeln und ihre Fähigkeit zur Modulation der Rotationsgeschwindigkeit (Chemokinesis) (Götz & Schmitt, 1987; Scharf, 2002) sowie ein neuer Mechanismus der effektiven Dephosphorylierung des Responsregulators, CheY2-P, durch Retrophosphorylierung von CheA (Sourjik & Schmitt, 1998).

Hier wurden drei neue Proteine, MotC, MotE und FliK (früher MotD), untersucht, von denen jedes für die Flagellenbewegung essentiell ist und die im enterobakteriellen System in dieser Form nicht auftreten.

MotC ist ein Periplasma-Protein, das in 1:1 Stöchiometrie an eine periplasmatische Extradomäne des H<sup>+</sup>-Kanalproteins MotB bindet und für dessen den Motor energetisierende Funktion entscheidend ist. Die Bedeutung von MotC wird durch ein eigenes Chaperon, MotE, unterstrichen; das Dimere MotE sorgt für die richtige Faltung und Monomer-Konformation von MotC und vermutlich auch für dessen Zielführung im Periplasma zum Kanalprotein MotB. Diese Befunde wurden bereits publiziert (Eggenhofer *et al.*, 2004). FliK-defiziente Mutanten von *S. meliloti* sind unbeweglich, weil sie keine intakten Flagellenfilamente produzieren und nicht, wie früher postuliert (Platzer *et al.*, 1997), weil die Motorrotation paralysiert ist (alte Bezeichnung „MotD“). In dieser Untersuchung wurde gezeigt, daß cytoplasmatisches FliK zwar an die FliM-Komponente im C-Ring des Motors bindet, aber (in Zusammenwirken mit FlhB) für die Längendetermination des Flagellenhaken verantwortlich ist. Ohne FliK wurden *polyhook*-Strukturen gebildet, die den Export und die Assemblierung von Flagellin von komplexen Filamenten blockieren. Die Export-Blockade resultiert wiederum in einer Abschaltung der Transkription der *fla*-Gene. Suppressormutanten im *flhB*-Gen können diese Defekte teilweise aufheben.

## 5.1 MotE ist ein spezifisches, periplasmatisches Chaperon für MotC

Chaperone sind Proteine, die andere Proteine bei deren Faltung und Anordnung unterstützen (Eisenberg, 1999; Horwich *et al.*, 1999). Bei Prokaryoten sind bislang eine große Zahl an cytoplasmatischen Chaperonen bekannt, von periplasmatischen Chaperonen weiß man bisher eher wenig. Abgesehen von der temperaturabhängigen Protease DegP (Behrens, 2002) und dem Chaperon für trimere Proteine der äußeren Membran, SurA (Rizzitello *et al.*, 2001), wurde ein Chaperon beschrieben, daß am Aufbau des Flagellenbasalkörperkomplexes beteiligt ist. Dabei handelt es sich um FlgA, ein Chaperon für das P-Ring-Protein FlgI (Nambu & Kutsukake, 2000) bei *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. Das bestuntersuchte periplasmatische Chaperon ist PapD, welches den Aufbau der P-Pili bei pathogenen *E. coli* Stämmen unterstützt (Sauer *et al.*, 2000; Thanassi & Hultgren, 2000). Weder die Primärstruktur noch die vorhergesagte Sekundärstruktur von MotE weisen signifikante Ähnlichkeit mit anderen bekannten Chaperonen auf. Zudem sind MotE-Orthologe nur in *den* Species bekannt, die auch ein *motC*-Gen besitzen. Daraus folgt, daß MotE neues periplasmatisches Chaperon spezifisch für das Motilitätsprotein MotC ist.

Proteine, die durch den Sec-Sekretionsweg ins Periplasma exportiert werden, erfahren eine enorme Veränderung des sie umgebenden Mediums, von reduzierend nach oxidierend (Brass *et al.*, 1986; Danese & Silhavy, 1998). Das oxidierende Milieu des Periplasmas forciert die Ausbildung von Disulfidbrücken (Rietsch & Beckwith, 1999). Tatsächlich entstehen MotE-Homodimere, indem die Cys53-Reste von zwei MotE-Monomeren eine Disulfidbrücke ausbilden (Abb. 15). Die Ausbildung funktioneller Dimere ist ein typisches Merkmal von periplasmatischen Proteinen (Pugsley, 1993). Diese, vermutlich durch DsbA (Disulfidoxidoreduktase) vermittelte Dimerisierung (Hiniker & Bradwell, 2003; Kadokura *et al.*, 2003) ist Voraussetzung für die Stabilität von MotE im Periplasma und folglich für seine Funktion. Das mutierte Protein, MotE C53A, erfährt sofortigen proteolytischen Abbau auf Grund seiner Unfähigkeit zu dimerisieren. Als Folge wird auch MotC proteolytisch schnell abgebaut, weil es nicht zur Bindung an MotE-Dimere kommt, die eine unkoordinierte MotC-Aggregation verhindern (Abb. 12). Ähnliches wurde für die gut untersuchten periplasmatischen Proteine PhoA (Bardwell *et al.*, 1991; Kamitani *et al.*, 1992) und alkalische Phosphatase (AP) von *E. coli* gezeigt. In einer *E. coli* Mutante mit einem Defekt in der periplasmatischen Disulfidbrücken-Bildung, bleibt alkalische

Phosphatase vollständig reduziert, und das im Wildtyp stabile Enzym wird innerhalb von 15 min vollständig abgebaut (Derman & Beckwith, 1991). Die beiden intramolekularen Disulphidbrücken der AP sind essentiell für dessen Struktur und Aktivität. Cystein-Austauschmutanten der AP weisen entweder eine stark reduzierte oder gar keine Enzymaktivität auf (DuBose & Hartl, 1991). Die Autoren schlossen daraus, daß die Ausbildung von Disulphidbrücken notwendig ist für eine Assemblierung der AP zu einer stabilen Konformation. Ebenso scheinen Stabilität und Funktion von MotE von der Ausbildung einer Disulphidbrücke abhängig zu sein und es wird postuliert, daß die Aktivität von DsbA für die Ausbildung der Disulphidbrücke zuständig ist. Die durch quantitative *Western*-Analysen bestimmte MotE:MotC Stöchiometrie von 2:1 bestätigt das Konzept eines funktionellen (MotE)<sub>2</sub>MotC-Komplexes. Die Hauptaufgabe periplasmatischen Chaperons MotE besteht deshalb in der korrekten Faltung von MotC und in der Hemmung einer unkoordinierten Aggregation von MotC. Dies wurde einerseits durch den schnellen Abbau von MotC in einer *motE*-Deletionsmutante (Abb. 8), und auch in einer MotE C53A-Mutante demonstriert, die unfähig ist, MotE-Dimere auszubilden (Abb. 16). Andererseits wurde experimentell nachgewiesen, daß die Bildung von MotC-Aggregaten durch MotE verhindert wird (Abb. 12).

Zusätzlich wird postuliert, daß MotE als Transporter dient, der MotC zu seinem Wirkungsort, der periplasmatischen Domäne von MotB bringt, wo der (MotE)<sub>2</sub>MotC-Komplex dissoziiert, sobald MotC an MotB bindet. Dieses Konzept wird durch die Analogie zum bekannten PapD-Chaperon gestützt, das als *shuttle* fungiert und als solches verantwortlich ist für die Anlieferung und die Assemblierung der Pili-Untereinheiten (Dodson *et al.*, 1993; Saulino *et al.*, 1998).

Dieses Modell der Chaperonfunktion von MotE ist in Abb. 37 zusammengefaßt, die den *S. meliloti* Flagellenmotor mit Hervorhebung des periplasmatischen Aspekts zeigt.

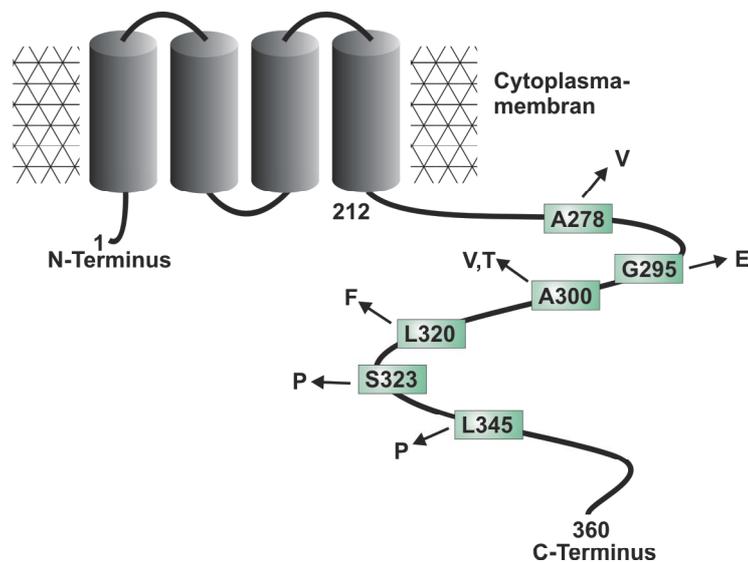


MotC und MotE, die als Prä-Proteine synthetisiert werden und N-terminal sekretorische Signalsequenzen für den Export ins Periplasma besitzen, werden durch den sekretorischen Exportkanal (Sec) ins Periplasma exportiert. Nachdem das Signalpeptid entfernt wurde und die Proteine den Translokationskanal verlassen haben, faltet sich MotE in seine native Konformation und bildet Dimere über Disulphidbrücken der Cys53-Reste. Diese Dimerisierung wird vermutlich durch DsbA katalysiert. Ein MotE-Dimer bindet als Chaperon an MotC und forciert einerseits dessen korrekte Faltung in eine stabile Konformation, andererseits positioniert es MotC an die periplasmatische Domäne von MotB. Der MotB-MotC-Komplex sorgt für den energetisierenden Protonenfluß durch den MotA-MotB-Kanal, als Basis für die Rotation des Flagellenmotors. In Abwesenheit von MotE (Abb. 37, B) aggregiert MotC nach dem Verlassen des Sec-Kanals. Diese MotC-Aggregate werden umgehend proteolytisch abgebaut. Damit wird die Ausbildung funktioneller MotB-MotC-Komplexe verhindert, und die Flagellen sind paralysiert.

## 5.2 FliK bestimmt die Länge des Flagellenhakens

Regulatoren der Länge des Flagellenhakens sind bei Enterobakterien bereits seit den siebziger Jahren bekannt. Der bestuntersuchte Regulator ist FliK aus *S. enterica* serovar *typhimurium*, dessen Fehlen zur Ausbildung von *polyhooks* führt (Kawagishi *et al.*, 1996; Patterson-Delafield *et al.*, 1973; Suzuki & Iino, 1981). In dieser Arbeit wurde der Regulator der Hakenlänge von *S. meliloti*, FliK, identifiziert und charakterisiert. Folgende Ergebnisse sprechen für diese Zuordnung: Die Deletion des *fliK*-Gens führt zur Ausbildung von Haken, die mit einer Längenvariation von 50-400 nm eine bis zu zehnfache Länge des Wildtyp-Hakens aufweisen und damit als *polyhooks* zu bezeichnen sind (Abb. 35). Diese *polyhooks* tragen zum großen Teil (> 99 %) keine Filamente. Tatsächlich exportierte eine *fliK*-Deletionsmutante kein Flagellin (Abb. 31). Es wurde postuliert, daß der verhinderte Export eine Anhäufung eines anti- $\sigma$ -Faktors bewirkt, der die *fla*-Transkription herunterreguliert. Tatsächlich wurde eine Repression der Transkription des *flaA*-Gens (Hauptflagellin-Gen) gezeigt (Tab. 11); der vermutete anti- $\sigma$ -Faktor von *S. meliloti* konnte jedoch bislang nicht identifiziert werden. Es gibt aber Hinweise darauf, daß das Genprodukt eines bislang noch nicht gründlich charakterisierten Leserahmens des *flagellar regulon*, *orf14*, als anti- $\sigma$ -Faktor fungieren könnte, weil in der  $\Delta$ *orf14*-Mutante die Flagellinproduktion hochreguliert wird (B. Scharf, nicht veröffentlicht). Das Auftreten von

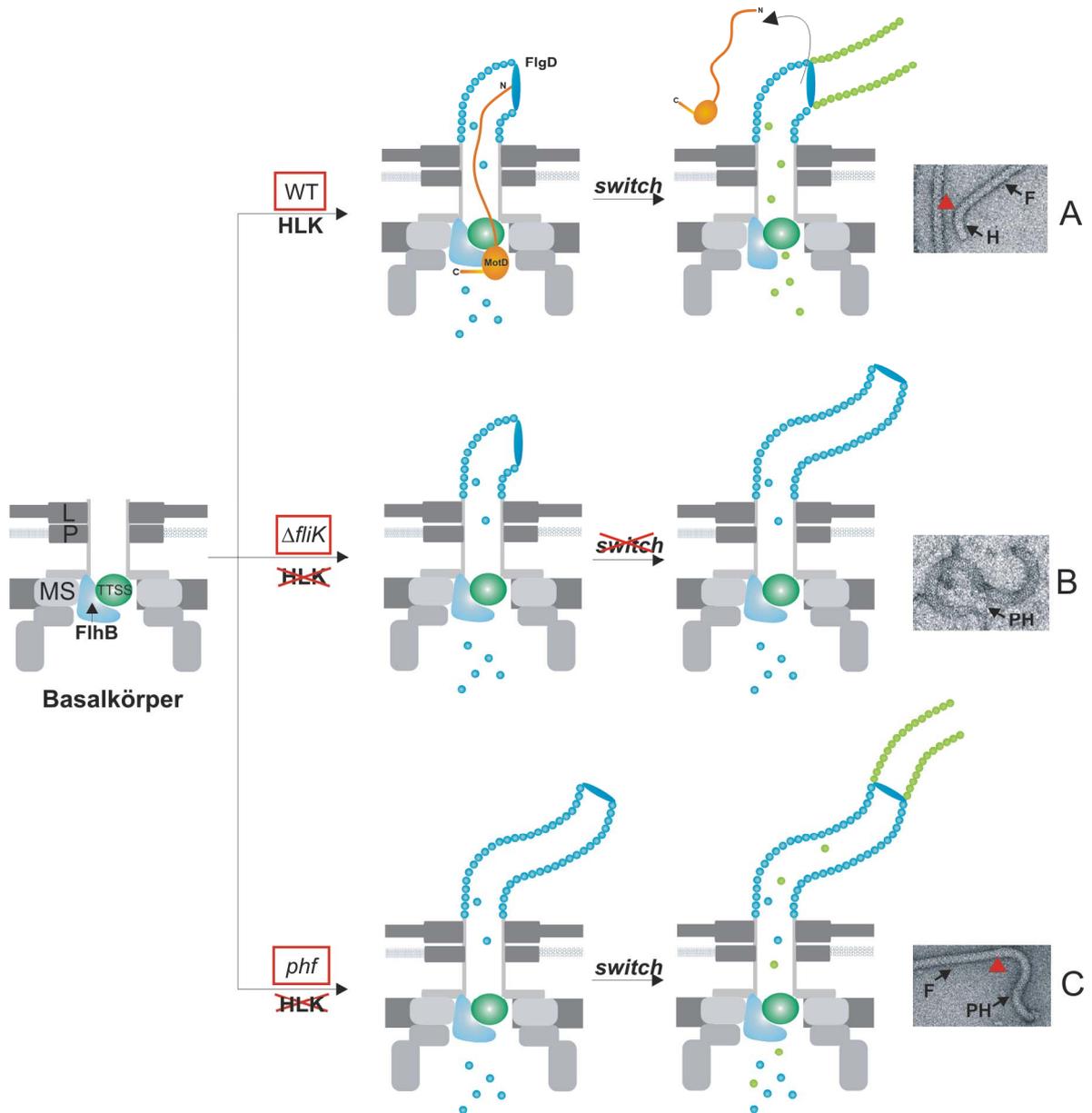
Suppressormutationen im *flhB*-Gen von  $\Delta$ *fliK*-Zellen belegt ferner die Identität von FliK als Maßstab für die Hakenlänge. Solche *phf* (*polyhook filament*)-Mutanten wurden in dieser Arbeit isoliert und genetisch, physiologisch, immunologisch und elektronenmikroskopisch charakterisiert. Sie waren schwach motil (ca. 30 % des WT, Tab. 12) und haben *polyhooks*, an deren distalem Ende ein Filament assembliert ist (Abb. 36); d.h., diese Mutanten sind in der Lage Flagelline zu exportieren, nicht aber die Hakenlänge zu kontrollieren. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, daß das FliK-Protein bifunktional agiert, also Hakenlänge und Flagellinexport separat reguliert, worauf im Rahmen eines Modells (Abb. 39) noch weiter eingegangen wird. Alle *phf*-Mutanten wiesen eine Punktmutation im *flhB*-Gen auf, deren resultierende AS-Austausche im Schema des FlhB-Proteins (Abb. 38) gezeigt werden.



**Abb. 38.** Postulierte Membrantopologie von FlhB von *S. meliloti* mit extragenischen *fliK*-Suppressormutationen. Positionen der natürlichen Aminosäurereste nummeriert, Pfeile und AS-Symbole markieren Suppressionen der *fliK*-Deletion.

Die für das *S. meliloti*-FliK erzielten Ergebnisse lassen sich mit Daten des *Salmonella*-FliK vergleichen. Dessen Deletion resultiert ebenfalls in immotilen Zellen, die *polyhooks* ausbilden (Kawagishi *et al.*, 1996; Patterson-Delafield *et al.*, 1973; Suzuki & Iino, 1981). Zudem ist die Transkription der Klasse III-Gene, zu denen auch das Flagellin-Gen *fliC* zählt, durch einen nicht-exportierten anti- $\sigma$ -Faktor (FlgM) herunterreguliert (Komeda & Iino, 1979; Kutsukake *et al.*, 1990; Suzuki & Iino, 1981). Es treten auch

Suppressormutationen im *flhB*-Gen auf, die den Defekt einer *fliK*-Deletion oder inaktivierenden Mutation teilweise kompensieren und *phf*-Mutanten generieren (Williams *et al.*, 1996; Kutsukake *et al.*, 1994). Trotz der mäßigen Konservierung von FlhB-Resten zwischen aus *S. meliloti* und *Salmonella* (33 % Identität), konnten analoge Aminosäurereste zugeordnet werden (Abb. 38). Dabei zeigte sich, daß die „hotspots“ der Suppressormutationen im *S. meliloti*- und *Salmonella*-FlhB z.T. übereinstimmen (Ala300, Gly295). Das weist eindeutig auf Funktionshomologien zwischen den verschiedenen Orthologen hin. Auch die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung des rekombinanten *S. meliloti*-FliK bestätigen die für *Salmonella* bekannten Daten. Die elongierte Konformation von FliK-Monomeren (Minamino *et al.* 2004), sowie die Instabilität der N- und C-Termini sind den FliK-Proteinen beider Spezies gemeinsam (4.2.3 und Abb. 21). Das entspricht der Funktion als Längenmaßstab. Erstaunlich ist daher, daß solche Struktur- und Funktionsanalogien auf recht verschiedenen Primär- und vorhergesagten Sekundärstrukturen von FliK beruhen. Lediglich ein kurzes (AS 297-402, Abb. 19) Sequenzmotiv, das *Flg\_hook*-Motiv (pfam 02120.11, Bateman *et al.*, 2004), ist allen bisher identifizierten Hakenlängenregulator-Proteinen gemeinsam. Abgesehen von diesem *Flg\_hook*-Motiv bilden die FliK-Proteine der  $\alpha$ -Proteobakterien (Abb. 18) eine eigene Gruppe. Auf einen möglichen Zusammenhang dieser Sequenzunterschiede mit der komplexen Flagellen- und Hakenstruktur wurde bereits hingewiesen (Raska *et al.*, 1976). Neu war die Bindung von FliK an die C-Ring-Komponente FliM. FliM erfüllt eine Doppelfunktion, wie hier gezeigt wurde (4.2.5). Einerseits nimmt FliM das Signal des aktivierten Responsregulators, CheY2-P, auf, der die Rotations-Geschwindigkeit reduziert, andererseits ist FliM ein wesentlicher Teil des Flagellen-Exportapparates. Es wurde nachgewiesen, daß *S. meliloti*-FliM die Signalbindedomäne von Enterobakterien nicht enthält, also eine andere Ligandenbindungsstelle besitzen muß. N-terminale Deletionen von FliM bis AS 15 führen zu einer Beeinträchtigung der Chemokinese (Tab. 10). Deshalb sollte dieser Bereich Teil der Bindestelle von CheY2-P sein. Eine weitergehende Deletion der AS 11-20 beeinträchtigt dagegen bereits den Export von Flagellin, was auf die Bedeutung dieser Reste für den Export hinweist (Tab. 10). Die exakte Bedeutung der FliK-FliM Wechselwirkung ist noch spekulativ. Ein Funktionsmodell der Regulation der Hakenlänge im Zusammenhang mit dem Flagellinexport wurde postuliert und wurde in Abb. 39 gezeigt.



**Abb. 39.** Modellvorstellung der Längenregulierung des Flagellenhakens durch FliK in *S. meliloti*-Wildtyp (WT),  $\Delta fliK$  und *polyhook-filament*-Mutante (*phf*). Abkürzungen und Symbole: L, L-Ring; P, P-Ring; MS, MS-Ring; TTSS, *Type three secretion system* (Typ-III-Exportapparat); FlhB, Exportapparatprotein; FlgD, Kappenprotein; HLK, Hakenlängenkontrolle; F, Filament; H, *hook* (Haken); PH, *polyhook*; blaue Kreise: Hakenprotein FlgE; grüne Kreise: Flagellinuntereinheiten FlaA, FlaB, FlaC, FlaD; rote Dreiecke markieren in den EM-Aufnahmen den Haken-Filament-Übergang (Details im Text).

Das Modell nimmt zwei Funktionen von FliK an: die Hakenlängenkontrolle (HLK) und die Vermittlung eines Signals an den Exportapparat, der daraufhin die Substratspezifität von Hakenproteinen auf Filamentproteine umstellt (*switch*). Beide Funktionen sind in *S. meliloti*-Wildtypzellen intakt (Abb. 39, A). FliK wird exprimiert und kann die Länge des Hakens dahingehend regulieren, daß er zu einer definierten Länge von  $55 \pm 5$  nm assembliert wird. Ist dies geschehen, wird FliK exportiert, weshalb es im Experiment im Zellkulturüberstand nachweisbar war (Abb. 32). Möglicherweise wird durch den Export von FliK ein Signal an FlhB weitergeleitet, worauf dieses den „*switch*“ vollzieht und nicht länger Hakenprotein exportiert, sondern Filamentproteine. Haken der Länge 55 nm sind absolut essentiell für korrekte Bündelung und somit Motilität. In  $\Delta$ *fliK*-Zellen kommt es zum Verlust der beiden Funktionen HLK und „*switch*“. Dies führt dazu, daß diese Zellen *polyhooks* ohne Filamente ausbilden und immotil sind (Abb. 39, B). Nun könnte man vermuten, daß das Ausbleiben des „*switch*“ bereits hinreichend wäre diesen Phänotyp hervorzurufen. Das Auftreten der *phf*-Mutanten beweist jedoch, daß unabhängig vom Umschalten der Substratspezifität die zweite Funktion von FliK, die HLK, vorhanden sein muß. Bestimmte AS-Austausche im C-terminalen Bereich von FlhB können die fehlende Signalwirkung von FliK bzgl. des „*switch*“ kompensieren (Abb. 38) und FlhB veranlaßt den Export von Filamentproteinen. Die Zellen besitzen folglich *polyhooks* mit assemblierten Filamenten (Abb. 39, C). Da die korrekte Hakenlänge essentiell für Bündelbildung und Motilität ist, erreichen diese Zellen nicht die Schwimffähigkeit des Wildtyps (Tab. 12).

Der genaue Mechanismus der Hakenlängenkontrolle und der Signalwirkung auf FlhB ist noch nicht aufgeklärt. Denkbar ist eine Variante, in der FliK sowohl mit FlgD, als auch mit FlhB interagiert. FlgD ist das Hakenkappenprotein, das die FlgE-Monomere zu der komplexen Hakenstruktur assembliert (Makishima *et al.*, 2001; Minamino & Macnab, 1999). Während des Hakenaufbaus wird das elongierte Molekül gestreckt, bis es schließlich seine Maximallänge erreicht. Anschließend kommt es zum Lösen der FlhB-FliK-Bindung, was FlhB wiederum zum Substrat-„*switch*“ veranlasst. Einige aus dem *Salmonella* Modell bekannte Indizien sprechen für diese Theorie. Einerseits wurde für FliK eine Bindung an FlhB und an FlgD festgestellt (Minamino *et al.*, 2004; T. Minamino, persönl. Mitteilung). Andererseits sind vom FliK-Analogen YscP aus *Yersinia* Insertionsmutanten bekannt, bei denen die künstliche Verlängerung von YscP mit beliebigen Peptidsequenzen zu entsprechend verlängerten Injektisomen, den Analogen der Haken, führt (Journet *et al.*, 2003). Zudem sind die YscP-Proteine von *Y. pestis* und *Y.*

*enterocolitica* unterschiedlich lang, was sich in entsprechenden Injektisomenlängen widerspiegelt. Dennoch ist diese Theorie nicht ganz hinreichend, da ein Verkürzen von FliK-Proteinen, sowie die Totaldeletion stets zu verlängerten Haken, sprich *polyhooks*, führen anstatt zu kürzeren (Hirano *et al.*, 1994; Makishima *et al.*, 2001). Man muß also eine Minimalgröße von FliK für die korrekte Funktion postulieren. Eine andere Hypothese, die Hakenlängenkontrolle unter Beteiligung des C-Rings betreffend, postulierten Makishima *et al.* (2001). Die Autoren gehen davon aus, daß der Innenraum des C-Rings als eine Art „Meßbecher“ (*masu* = japan. Becher, bzw. *measuring cup*, Makishima *et al.*, 2001) fungiert, der im Wildtyp ca. 120 FlgE-Moleküle faßt. Dem entsprechen Mutanten in den C-Ring-Komponenten *fliM*, *fliN* und *fliG*, die jeweils zu definiert verkürzten Haken führen (Makishima *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 1990). Diese Modellvorstellung schreibt FliK nicht die Funktion eines Hakenlängenmaßstabs, sondern die einer Hakenelongations-Determination zu. Möglicherweise ist eine Kombination der beiden Modelle wirksam, die sowohl das Zur-Verfügung-Stellen einer bestimmten FliE-Menge (*masu*) als auch die Längenregulation bei der Assemblierung durch FliK vorsieht.

### 5.3 Ausblick

Wie fast immer, ruft die Lösung von Problemen neue Fragen auf.

- Welche Funktion hat MotC, das durch MotE eigens in die aktive Konformation gebracht und ans (MotB-) Ziel transportiert wird? Die Bedeutung von MotC für MotB (und den H<sup>+</sup>-Fluß) könnte durch Punktmutationen eingegrenzt werden, die eine MotC-MotB-Bindung verstärken oder abschwächen. Ferner sollte nach möglichen Suppressormutanten von  $\Delta motC$  gesucht werden, die vielleicht interessante Antworten zur Funktion der außergewöhnlichen Extradomäne des periplasmatischen Teils von MotB geben könnten.
- Die FliK-Funktion muß noch exakter definiert werden. Dazu sind Längenvariationen (wie bei YscP; 5.2) und Vermessen der Hakenlängen ein möglicher Weg. Ein weiterer Zugang wären genaue Analysen von Unterschieden zwischen den *polyhooks* von  $\Delta fliK$  und *phf*-Mutanten, werden im letzten Fall exakte Vielfache des WT-Hakens produziert, die einen Filamentaufbau ermöglichen, im

ersteren Fall jedoch nicht (oder nur zufällig)? Auch Punktmutationen im *fliK*-Gen, die zu Funktionsveränderungen führen, wären von Bedeutung. Was passiert, wenn der C-terminale Bereich von *flhB* deletiert wird?

- Beruht die stark reduzierte *fla*-Transkription in Export-defekten ( $\Delta$ *fliK*) Mutanten von *S. meliloti* wie bei Enterobakterien auf einem anti- $\sigma$ -Faktor? Kandidatengene, wie *orf14*, sollten daraufhin mittels Sequenzvergleichen und Mutationen getestet werden, ob ihr Genprodukt dieser Funktion entspricht. Es sollte auch untersucht werden, ob und welche Merkmale diejenigen Proteine gemeinsam haben, die via Flagellen-Exportapparat transportiert werden.

## 6. Zusammenfassung

Enterobakterien wechseln die Schwimmrichtung durch Umkehr des Rotationssinns der Geißel von ccw (*counter clockwise*) nach cw (*clockwise*). Die Flagellen von *S. meliloti* rotieren dagegen ausschließlich cw, aber die Motoren variieren ihre Rotationsgeschwindigkeit. *S. meliloti* besitzt die *E. coli*-Analoga MotA und MotB, die den Protonenkanal bilden und für die Energetisierung des Motors zuständig sind. Zusätzlich wurden bei *S. meliloti* drei neue Gene identifiziert: *motC*, *motE* und *fliK* (ehem. *motD*). Die Genprodukte von zweien, MotE und FliK, wurden hier untersucht und ihre Funktion als essentielle Komponenten des Flagellums aufgeklärt.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

### A. MotE:

1. MotE besitzt ein Standardsignalpeptid für die Sekretion ins Periplasma. Ein gereinigter anti-MotE-Antikörper lokalisierte MotE in der periplasmatischen Fraktion.
2. Eine inaktivierende Deletion von *motE* führte zu einer 70 %igen Reduktion der MotC-Menge in diesen Zellen. Der *motC*-Promotor wurde nicht herunterreguliert, stattdessen wird MotC durch MotE posttranslational stabilisiert. Die *motE*-Deletion hatte auf Motor- und Flagellenkomponenten, außer MotC, keinen Einfluß.
3. Durch Affinitäts-*Western blot*-Analysen wurde eine spezifische Bindung von MotE an MotC nachgewiesen. Diese Bindung von MotE erfolgte sowohl in Monomer, als auch in Dimer-Konformation.
4. Durch gezielte Mutagenese wurde der einzige Cys53-Aminosäurerest als essentieller Rest für eine MotE-Dimerisierung identifiziert. Eine MotE C53A-Mutante war immotil; das rekombinante MotE-C53A-Protein war wegen seiner Unfähigkeit zur Dimerisierung instabil.
5. Die intrazelluläre Stöchiometrie von MotC und MotE beträgt 1:2, was auf einen periplasmatischen (MotE)<sub>2</sub>MotC-Komplex schließen läßt.
6. MotE blockierte die unspezifische Aggregation von MotC und sorgte stattdessen für die Aufrechterhaltung der nativen monomeren Form von MotC.

Das MotE-Dimere entspricht damit der Definition eines periplasmatischen Chaperons von MotC. Ein Modell der MotE-Funktion weist diesem die Aufgaben der Stabilisierung von MotC und dessen Zielführung zum MotB-Kanalprotein zu.

## B. FliK:

1. Mit Hilfe von neuartigen Suchalgorithmen und erweiterten Datenbankeinträgen wurde in der FliK-Primärstruktur ein *Flg\_hook*-Motiv, das bei Regulatorproteinen der Länge des Flagellenhakens bekannt ist, identifiziert.
2. Eine limitierte Proteolyse des FliK-Proteins wies auf ungefaltete, instabile N- und C-Termini und ein stabiles zentrales Fragment im Bereich des *Flg\_hook*-Motivs hin.
3. Durch Affinitätschromatographie und Affinitäts-*Western blot*-Analysen wurde FliM als Interaktionspartner von FliK identifiziert.
4. Das FliK-Protein ist stark elongiert und liegt als Monomer vor.
5. Eine vollständige Deletion von *fliK* resultiert nicht, wie bisher postuliert (Platzer *et al.*, 1997) in einem *mot<sup>-</sup>*-Phänotyp, sondern in nicht-flagellierten *fla<sup>-</sup>*-Zellen. Die Transkription des Hauptflagellings, *flaA*, wurde durch die *fliK*-Deletion stark herunterreguliert. (Die mögliche Repression durch einen anti- $\sigma$ -Faktor der auf Grund des defekten Exportkanals nicht aus dem Cytoplasma entfernt werden kann, wurde postuliert.) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von  $\Delta$ *fliK*-Zellen zeigten, wie auf Grund des fehlenden Längenregulators erwartet, *polyhooks*.
6. Das MotD-Protein selbst ist ein Exportsubstrat des flagellenspezifischen Exportapparates.
7. Es wurden extragenische Suppressormutanten isoliert, die in Analogie zu den FliK-Suppressoren von *Salmonella* auf Punktmutationen im *flhB*-Gen zurückgeführt werden konnten. Diese Mutanten waren schwach motil. Sie entsprechen den *phf* (*polyhook filament*)-Mutanten von Enterobakterien; das elektronen-mikroskopische Bild zeigte *polyhook*-Strukturen mit assemblierten komplexen Flagellen.

Nach diesen Befunden ist FliK ein, bis auf das *Flg\_hook*-Motiv, neues Protein zur korrekten Assemblierung des Hakens mit Funktionsanalogie zum enterobakteriellen FliK-Protein. Ein Modell der Längenregulierung des Flagellenhakens von *S. meliloti* wird postuliert.

## 7. Literaturverzeichnis

- Armitage, J. P. and Schmitt, R. (1997).** Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter shaeroides* and *Sinorhizobium meliloti* - variations on a theme? *Microbiology* **143**, 3671-3682
- Attmannspacher, U. (1999).** Deletionsanalyse von *mot*-Genen bei *Sinorhizobium meliloti*  
Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Bachmann, B.J. (1990).** Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. *Microbiol Rev* **54**, 130-197
- Bardwell, J.C., McGovern, K., and Beckwith, J. (1991)** Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* **67**, 581-589.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R.D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., Sonnhammer, E.L., Studholme, D.J., Yeats, C. and Eddy, S.R. (2004)** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **32** (Database issue), 138-141.
- Bennett, J. C. Q., Thomas, J., Fraser, G. M. and Hughes, C. (2001).** Substrate complexes and domain organization of the *Salmonella* flagellar export chaperones FlgN and FliT. *Mol Microbiol* **39(3)**, 781-791
- Behrens, S. (2002)** Periplasmic chaperones--new structural and functional insights. *Structure (Camb)* **10**: 1469-1471.
- Berg, H. C. (2000).** Motile behavior of bacteria. *Physics Today* Jan 2000: 24-29
- Berg, H. C. (2003).** The rotary motor of bacterial flagella. *Annu Rev Biochem.* **72**:19-54.
- Berg, H. C. and Brown, D. A. (1972).** Chemotaxis in *Escherichia coli* analysed by three-dimensional tracking. *Nature* **239**, 500-504
- Blair, D. F. (2003).** Flagellar movement driven by proton translocation. *FEBS Lett.* **545**:86-95.
- Blair, D. F. and Berg, H. C. (1990).** The MotA protein of *Escherichia coli* is a protonconducting component of the flagellar motor. *Cell* **60**, 439-449
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brass, J.M., Higgins, C.F., Foley, M., Rugman, P.A., Birmingham, J., and Garland, P.B. (1986)** Lateral diffusion of proteins in the periplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **165**: 787-795.

- Braun, T.F. and Blair, D. F. (2001).** Targeted disulfide cross-linking of the MotB protein of *Escherichia coli*: evidence for two H(+) channels in the stator Complex. *Biochemistry* **40**: 13051-13059.
- Bren, A. and Eisenbach, M. (1998).** The N terminus of the flagellar switch protein, FliM, is the binding domain for the chemotactic response regulator, CheY. *J Mol Biol*, **278**: 507-514.
- Cabanes, D., Boistard, P., and Batut, J. (2000).** Identification of *Sinorhizobium meliloti* Genes Regulated during Symbiosis. *J Bacteriol* **182**: 3632-3637.
- Chen, X. and Berg, H.C. (2000).** Torque-speed relationship of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli*. *Biophys. J.* **78**: 1036–1041.
- Cheng, L. W. and Schneewind, O. (1999).** *Yersinia enterocolitica* type II secretion. On the role of SycE targeting YopE into HeLa cells. *J Biol Chem* **274**: 22102-22108.
- Chun, S. Y. and Parkinson, J. S. (1988).** Bacterial motility - Membrane topology of the *Escherichia coli* MotB protein. *Science* **239**: 276-278.
- Danese, P.N., and Silhavy, T.J. (1998).** Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 59-94.
- Dean, G. D., Macnab, R. M., Stader, J., Matsumura, P. and Burks, C. (1984).** Gene sequence and predicted amino acid sequence of the MotA protein, a membrane associated protein required for flagellar rotation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **159**: 991-999-
- DeMaagd, R. A. and Lugtenberg, B. (1986).** Fractionation of *Rhizobium leguminosarum* Cells into Outer Membrane, Cytoplasmic Membrane, Periplasmic, and Cytoplasmic Components. *J Bacteriol* **167**: 1083-1085.
- Derman, A. I., and Beckwith, J. (1991).** *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* **173**: 7719-7722.
- Dodson, K. W., Jacob-Dubuisson, F., Striker, R. T., and Hultgren, S. J. (1993).** Outer-membrane PapC molecular usher discriminately recognizes periplasmic chaperone-pilus subunit complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**: 3670-3674.
- DuBose, R. F., and Hartl, D. L. (1991).** Evolutionary and structural constraints in the alkaline phosphatase of *E. coli*. In *Evolution at the molecular level*. Selander, R.K., Clark, A.G. and Whittam, T.S. (eds). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, pp. 58-76.
- Eggenhofer, E. (2001).** Molekulare Charakterisierung von zwei essentiellen Komponenten der Motorfunktion bei *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Eggenhofer, E., Haslbeck, M. and Scharf, B. (2004).** MotE serves as a new chaperone specific for the periplasmic motility protein, MotC, in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **52**: 701-712.

- Elkan, G. H. and Bunn, C. R. (1992).** The rhizobia, In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K.-H. Schleifer eds. The prokaryotes Springer Verlag, New York, p. 2197-2213
- Eisenberg, D. (1999).** How chaperones protect virgin proteins. *Science* **285**: 1021-1022.
- Eisenbach, M. (1996).** Control of bacterial chemotaxis. *Mol Microbiol* **20**: 903-910.
- Fan, F. and Macnab, R. M. (1996).** Enzymatic characterization of FliI. An ATPase involved in flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **271**: 31981-31988.
- Fernandez, L. A. and Berenguer, J. (2000).** Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 21-44.
- Fraser, G. M., Bennett, J. C. Q. and Hughes, C. (1999).** Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Mol Microbiol* **32**: 569-580.
- Garza, A. G., Harris, H. L., Stoebner, R. A. and Manson M. D. (1995).** Motility protein interactions in the bacterial flagellar motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 1970-1974.
- Götz, R., Limmer, N., Ober, K., and Schmitt, R. (1982):** Motility and chemotaxis in two strains of *Rhizobium* with complex flagella. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 789-798.
- Götz, R. and Schmitt (1987).** *Rhizobium* swims by unidirectional, intermittent rotation of righthanded flagellar helices. *J Bacteriol* **169**: 3146-3150.
- Halbach, A. (2003).** Wechselwirkung des neuen Motorproteins MotC von *Sinorhizobium meliloti* mit MotB. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Haramaya, S. and Iino, T. (1976).** Phototactic response of aerobically cultivated *Rhodospirillum rubrum*. *J Gen Microbiol* **94**: 173-179.
- Haslbeck, M. (1997).** Two Hybrid-Analysen von Wechselwirkungen zwischen Motorproteinen in *Rhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Hess, S. L., Suchin, C. R. and Saltiel, A. R. (1991).** The specific protein phosphatase inhibitor okadaic acid differentially modulates insulin action. *J Cell Biochem*, **45**: 374-380.
- Hiniker, A., and Bardwell, J. C. (2003).** Disulfide bond isomerization in prokaryotes. *Biochemistry* **42**: 1179-1185.
- Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K. and Aizawa, S. (1994).** Roles of FliK and FlhB in Determination of Flagellar Hook Length in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 5439-5449.
- Hirano, T., Minamino, T., Namba, K. and Macnab, R. M. (2003).** Substrate specificity classes and the recognition signal for *Salmonella* type III flagellar export. *J Bacteriol* **185**: 2485-2492.

- Homma, M., Komeda, Y., Iino, T. and Macnab, R. M. (1987).** The *flaFLX* gene product of *Salmonella typhimurium* is a flagellar basal body component with a signal peptide for export. *J Bacteriol* **169**: 1493-1498.
- Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T. and Macnab, R. M. (1990).** FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **211**: 465-477.
- Horwich, A. L., Weber-Ban, E. U. and Finley, D. (1999).** Chaperone rings in protein folding and degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 11033-11040.
- Imae Y, Atsumi T. (1989).** Na<sup>+</sup>-driven bacterial flagellar motors. *J Bioenerg Biomembr* **6**: 705-716.
- Jäckel, P. (2004).** Funktionsanalyse des periplasmatischen Motilitätsproteins MotC von *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Jones, C. J., Homma, M. and Macnab, R. M. (1987).** Identification of proteins of the outer (L and P) rings of the flagellar basal body of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 1489-1492.
- Jones, C. J., Homma, M. and Macnab, R. M. (1989).** L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J Bacteriol* **171**: 3890-3900.
- Jones, C. J., Macnab, R. M., Okino, H. and Aizawa, S. (1990).** Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **212**: 377-387. Erratum in: *J Mol Biol* **215**: 331.
- Journet, L., Agrain, C., Broz, P. and Cornelis, G. R. (2003).** The needle length of bacterial injectisomes is determined by a molecular ruler. *Science* **302**: 1757-1760.
- Kadokura, H., Katzen, F., and Beckwith, J. (2003).** Protein Disulfide Bond Formation in Prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **9**: 111-135.
- Kamitani, S., Akiyama, Y., and Ito, K. (1992).** Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *Embo J.* **11**: 57-62.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., Tabata, S. (2000).** Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA res* Dec **31;7 (6)** 331-338.
- Kawagishi I., Homma, M., Williams, A. W. and Macnab, R. M. (1996).** Characterization of the flagellar hook length control protein fliK of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 2954-2959.

- Khan S., Dapice, M. and Reese, T. H. (1988).** Effects of *mot* gene expression on the structure of flagellar motor. *J Mol Biol* **202**: 575-584.
- Kihara, D. (2001).** Genome databases on the Internet. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **46**: 2639-45.
- Komeda, Y. and Iino, T. (1979).** Regulation of expression of the flagellin gene (*hag*) in *Escherichia coli* K-12: analysis of *hag-lac* gene fusions. *J Bacteriol* **139**: 721-729.
- Kort, E. N., Goy, M. F., Larsen, S. H. and Adler, J. (1975).** Methylation of membrane protein involved in bacterial chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**: 3939-3943.
- Krupski, G., Götz, R., Ober, K., Pleier, E. and Schmitt, R. (1985).** Structures of complex flagellar filaments in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **162**: 361-366.
- Kutsukake, K., Okada, T., Yokoseki, T. and Iino, T. (1994).** Sequence analysis of the *flgA* gene and its adjacent region in *Salmonella typhimurium*, and identification of another flagellar gene, *flgN*. *Gene* **143**: 49-54.
- Kutsukake, K., Minamino, T. and Yokoseki, T. (1994b).** Isolation and characterization of FliK-independent flagellation mutants from *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**: 7625-7629.
- Kutsukake, K., Ooya, Y. and Iino, T. (1990).** Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **172**: 741-747.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982)** A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laszlo, D.J.; and Taylor, B. L. (1981).** Aerotaxis in *Salmonella typhimurium*: role of electron transport. *J Bacteriol* **145**: 990-1001.
- Li, M. and Hazelbauer, G. L. (2004).** Cellular stoichiometry of the components of the chemotaxis signaling complex. *J Bacteriol* **186**: 3687-3694.
- Li, M. and Schweizer, H. P. (1993).** Resolution of common DNA sequencing ambiguities of GC-rich templates by terminal deoxynucleotidyl transferase without dGTP analogues. *Focus* **14/15**: 19-20.
- Lloyd, S.A. and Blair, D. F. (1997).** Charged residues of the rotor protein FliG essential for torque generation in the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* **266**: 733-744.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (Hrsg.)(1998).** Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Lowe, G., Meister, M. and Berg H.C. (1987).** The proton flux through the bacterial flagellar motor. *Nature* **325**: 637-640.

- Macnab, R. M. (1996).** Flagella and motility In: *Escherichia coli* and *Salmonella* (Neidhardt, F., Curtiss, R. III, Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H. E., eds.), ASM Press, Washington, D.C., pp. 123-145
- Macnab, R.M. (2004).** Type III flagellar protein export and flagellar assembly. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 207-217.
- Maeda, K., Imae, Y., Shioi, J. I. and Oosawa, F. (1976).** Effect of temperature on motility and chemotaxis of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **127**, 1039-1046
- Magariyama, Y., Sugiyama, S., Muramoto, K., Maekawa, Y., Kawagishi, I., Imae, Y. and Kudo, S. (1994).** Very fast flagellar rotation. *Nature* **371**, 752.
- Makishima, S., Komoriya, K., Yamaguchi, S. and Aizawa, S. I. (2001).** Length of the flagellar hook and the capacity of the type III export apparatus. *Science* **291**: 2411-2413.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982).** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Meister, M., Lowe G. and Berg, H.C. (1987).** The proton flux through the bacterial flagellar motor. *Cell* **49**, 643-650
- Miller, J.H. (1972)** *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Minamino, T. and Macnab R. M. (2000).** Interactions among components of the *Salmonella* flagellar export apparatus and its substrates. *Mol. Microbiol* **35**: 1052-1064.
- Minamino, T. and Aizawa, S. I. (2003).** Biogenesis of flagella: export of flagellar proteins via the flagellar machine. In *Protein Secretion Pathway in Bacteria* (Oudega, B., ed.), pp. 249-270, Kluwer academic Publishers, The Netherlands.
- Minamino, T., Gonzalez-Pedrajo, B., Yamaguchi, K., Aizawa, S. I. and Macnab, R. M. (1999).** FliK, the protein responsible for flagellar hook length control in *Salmonella*, is exported during hook assembly. *Mol Microbiol* **34**: 295-304.
- Minamino, T., Doi, H. and Kutsukake, K. (1999).** Substrate specificity switching of the flagellum-specific export apparatus during flagellar morphogenesis in *Salmonella* thyphimurium. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 1301-1303.
- Minamino, T., Gonzalez-Pedrajo, B., Kihara, M., Namba, K. and Macnab, R. M. (2003).** The ATPase FliI can interact with the type III flagellar protein export apparatus in the absence of its regulator FliH. *J Bacteriol* **185**: 3983-3988.
- Minamino, T., Saijo-Hamano, Y., Furukawa, Y., Gonzalez-Pedrajo, B., Macnab, R. M. and Namba, K. (2004).** Domain organization and function of *Salmonella* FliK, a flagellar hook-length control protein. *J Mol Biol* **341**: 491-502.

- Muramoto, K., Makishima, S., Aizawa, S. I. and Macnab, R. M. (1998).** Effect of the cellular level of FliK on flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* **277**: 871-882.
- Murzin A. G., Brenner S. E., Hubbard T., Chothia C. (1995)** SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *J. Mol. Biol.* **247**: 536-540.
- Muschler, P. (2000).** Funktionsanalyse von Rezeptoren, Elementen der Signalkette und des Effektors der Chemotaxis bei *Sinorhizobium meliloti*. Dissertation, Universität Regensburg.
- Namba, K. and Vonderviszt, F. (1997).** Molecular architecture of bacterial flagellum. *Quarterly Reviews of Biophysics* **30**: 1-65.
- Nambu, T. and Kutsukake, K. (2000).** The *Salmonella* FlgA protein, a putative periplasmatic chaperone essential for P ring formation. *Microbiology* **146**: 1171-1178.
- Novick, R. P., Clowes, R. C., Cohen, S. N., Curtis, R., Datta, N. and Falkow, S. (1976).** Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol Rev* **40**: 168-189.
- Ochman, H. and Wilson, A. C. (1987).** Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol* **26**: 74-86.
- Olsen, G. J., Woese, C. R. and Overbeek, R. (1994).** The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. *J Bacteriol* **176**: 1-6.
- Patterson-Delafield, J., Martinez, R. J., Stocker, B. A. and Yamaguchi, S. (1973).** A new fla gene in *Salmonella typhimurium*--flaR--and its mutant phenotype--superhooks. *Arch Mikrobiol* **90**: 107-120.
- Pichler, K. (2004).** Wechselwirkung des aktivierten und nicht-aktivierten Responsregulators CheY2 mit zwei Komponenten des Flagellenmotors von *Sinorhizobium meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg.
- Platzer, J. (1996).** Struktur- und Funktionsanalyse von *fla*- und *mot*-Genen aus *Rhizobium meliloti*. Dissertation, Universität Regensburg
- Platzer, J., Sterr, W., Hausmann, M, and Schmitt, R. (1997).** Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **179**: 6391-6399.
- Pleier, E., and Schmitt, R. (1989).** Identification and sequence analysis of two related flagellin genes in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **171**: 1467-1475.
- Pleier, E. and Schmitt, R. (1991).** Expression of two *Rhizobium meliloti* genes and their contribution to the complex filament structure. *J Bacteriol* **173**: 2077-2085.
- Pugsley, A. P. (1993).** The complete secretory pathway in Gram-negative bacteria *MicrobiolRev* **57**: 50-108.

- Raska, I., Mayer, F., Edelbluth, C. and Schmitt, R. (1976).** Structure of Plain and Complex Flagellar Hooks of *Pseudomonas rhodos*. *J Bacteriol* **125**: 679-688.
- Ried, J. L. and Collmer, A. (1987).** An *nptI-sacB-sacR* cartridge for constructing directed, unmarked mutations in gram-negative bacteria by marker exchange- eviction mutagenesis. *Gene* **57**: 239-46.
- Rietsch, A., and Beckwith, J. (1999).** The genetics of disulfide bond metabolism. *Annu. Rev. Genet.* **32**: 163-184.
- Rizzitello, A.E., Harper, J.R., and Silhavy, T.J. (2001).** Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 6794-6800.
- Samatey, F.A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M. and Namba, K. (2001).** Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, **410**: 331-337.
- Sauer, F.G., Barnhart, M., Choudhury, D., Knight, S.D., Waksman, G., and Hultgren, S.J. (2000).** Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 548-556.
- Schaefer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. and Pühler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derives from the *Escherichia coli* plasmid pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73
- Scharf, B. (2002).** Real-time imaging of fluorescent flagellar filaments of *Rhizobium lupini* H13-3: flagellar rotation and pH-induced polymorphic transitions. *J Bacteriol*, **184**: 5979-5986.
- Scharf, B. and Schmitt, R. (2003).** Sensory transduction to the flagellar motor of *Sinorhizobium meliloti*. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **4**: 183-186.
- Scharf, B., Schuster-Wolff-Bühring, H., Rachel, R. and Schmitt, R. (2001).** Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* Flagellin genes: importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J Bacteriol* **183**: 5334-5342.
- Schmitt, R., Bamberger, I., Acker, G. and Mayer, F. (1974).** Feinstrukturanalyse der komplexen Geißeln von *Rhizobium lupini* H13-3. *Arch Microbiol* **100**: 145-162.
- Schmitt, R. (1997).** Molekulare Propeller: Bakteriengeißeln und ihr Antrieb. *Biol Zeit* **1**: 40-47
- Schmitt, R. (2002).** Sinorhizobial chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. *Microbiology*, **148**: 627-631.
- Schmitt, R. (2003).** Helix Rotation Model of the Flagellar Rotary Motor. *Biophys J* **85**: 843-852.

- Sharp, L.L., Zhou, J. and Blair, D. F. (1995).** Tryptophanscanning mutagenesis of MotB, an integral membrane protein essential for flagellar rotation in *Escherichia coli* *Biochemistry*, **34**: 9166-9171
- Simon, R., Prierer, U. and Pühler, A. (1983).** A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria *Bio/Technology* **1**: 783-791.
- Sourjik, V. and Berg, H. C. (2000).** Localization of components of the chemotaxis machinery of *Escherichia coli* using fluorescent protein fusions. *Mol Microbiol* **37**: 740-751.
- Sourjik, V. and Schmitt, R. (1996).** Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Molecular Microbiol* **22(3)**, 427-436
- Sourjik, V. and Schmitt, R. (1998).** Phosphotransfer between CheA, CheY1, and CheY2 in the Chemotaxis Signal Transduction Chain of *Rhizobium meliloti*. *Biochemistry* **37**: 2327-2335.
- Sourjik, V., Sterr, W., Platzer, J., Bos, I., Haslbeck, M. and Schmitt, R. (1998).** Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* **228**: 283-290.
- Stock, J. B. and Surette, M.G. (1996).** Chemotaxis. In: *Escherichia coli* and *Salmonella* (Neidhardt, F., Curtiss, R. III, Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., Umbarger, H. E., eds.), ASM Press, Washington, D.C., pp. 1103-1129.
- Stöhr, R. (1999).** Analyse von neuen Genen des „flagellar regulon“ von *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. Diplomarbeit, Universität Regensburg
- Stolz, B. and Berg, H. C. (1991).** Evidence for interactions between MotA and MotB, torquegenerating elements of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**: 7033-7037.
- Suzuki, T. and Iino, T. (1981).** Role of the flaR gene in flagellar hook formation in *Salmonella* spp. *J Bacteriol* **148**: 973-979.
- Thanassi, D. G. and Hultgren, S. J. (2000).** Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 420-430.
- Thorstenson, Y. R., Zhang, Y., Olson, P. S. and Mascarenhas, D. (1997).** Leaderless polypeptides efficiently extracted from whole cells by osmotic shock. *J Bacteriol* **179**: 5333-5339.
- Trachtenberg, S., DeRosier, D. J. and Macnab, R. M. (1987).** Three-dimensional structure of the complex flagellar filament of *Rhizobium lupini* and its relation to the structure of the plain filament. *J Mol Biol* **195**: 603-620.

- Tso, W. W. and Adler, J. (1974).** Negative chemotaxis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **118**: 560-576.
- Welch, M., Oosawa, K., Aizawa, S.I. and Eisenbach, M. (1994).** Effects of phosphorylation, Mg<sup>2+</sup>, and conformation of the chemotaxis protein CheY on its binding to the flagellar switch protein FliM. *Biochemistry*, **33**: 10470-10476.
- Williams, A. W., Yamaguchi, S., Togashi, F., Aizawa, S. I., Kawagishi, I. and Macnab, R. (1996).** Mutations in *fliK* and *flhB* affecting flagellar hook and filament assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **178**: 2960-2970.
- Yamaguchi, S., Fujita, H., Ishihara, A., Aizawa, S. I. and Macnab, R. M. (1986).** Subdivision of flagellar genes of *Salmonella typhimurium* into regions responsible for assembly, rotation and switching. *J Bacteriol* **166**: 187-193.
- Yokoseki, T., Kutsukake, K., Ohnishi, K. and Iino, T. (1995).** Functional analysis of the flagellar genes in the *fliD* operon of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* **141**: 1715-1722.
- Yonekura, K., Maki, S., Morgan, D. G., DeRosier, D.J., Vonderviszt, F., Imada, K. and Namba, K. (2000).** The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. *Science* **290**: 2148-2152.
- Young, J. P. W. (1992).** Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: G. Stacy, R. H. Burris and H. J. Evans eds. Biological nitrogenfixation. Chapman and Hall, New York, pp. 43-86.
- Zhou, J., Fazio, R. T. and Blair, D. F. (1998).** Electrostatic interactions between rotor and stator in the bacterial flagellar motor. *Procl Natl Acad Sci USA* **95**: 6436-6441.
- Zhou, J., Fazio, R. T. and Blair, D. F. (1995).** Membrane topology of the MotA protein of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **251**: 237-242.
- Zhou, J. and Blair, D. F. (1997).** Residues of the cytoplasmic domain of MotA essential for torque generation in the bacterial flagellar motor. *J Mol Biol*, **273**: 428-439.

# Anhang

Im Anhang sind folgende *alignments* und Abbildungen aufgeführt:

- **A1.** Vergleich der abgeleiteten Peptidsequenzen von *flhB* aus *S. meliloti* und *S. enterica* serovar *typhimurium*
- **A2.** Vergleich der abgeleiteten Peptidsequenzen von *fliM* aus *S. meliloti* und *E. coli*
- **A3.** Übersichtsmodell des Flagellenmotors von *S. meliloti*

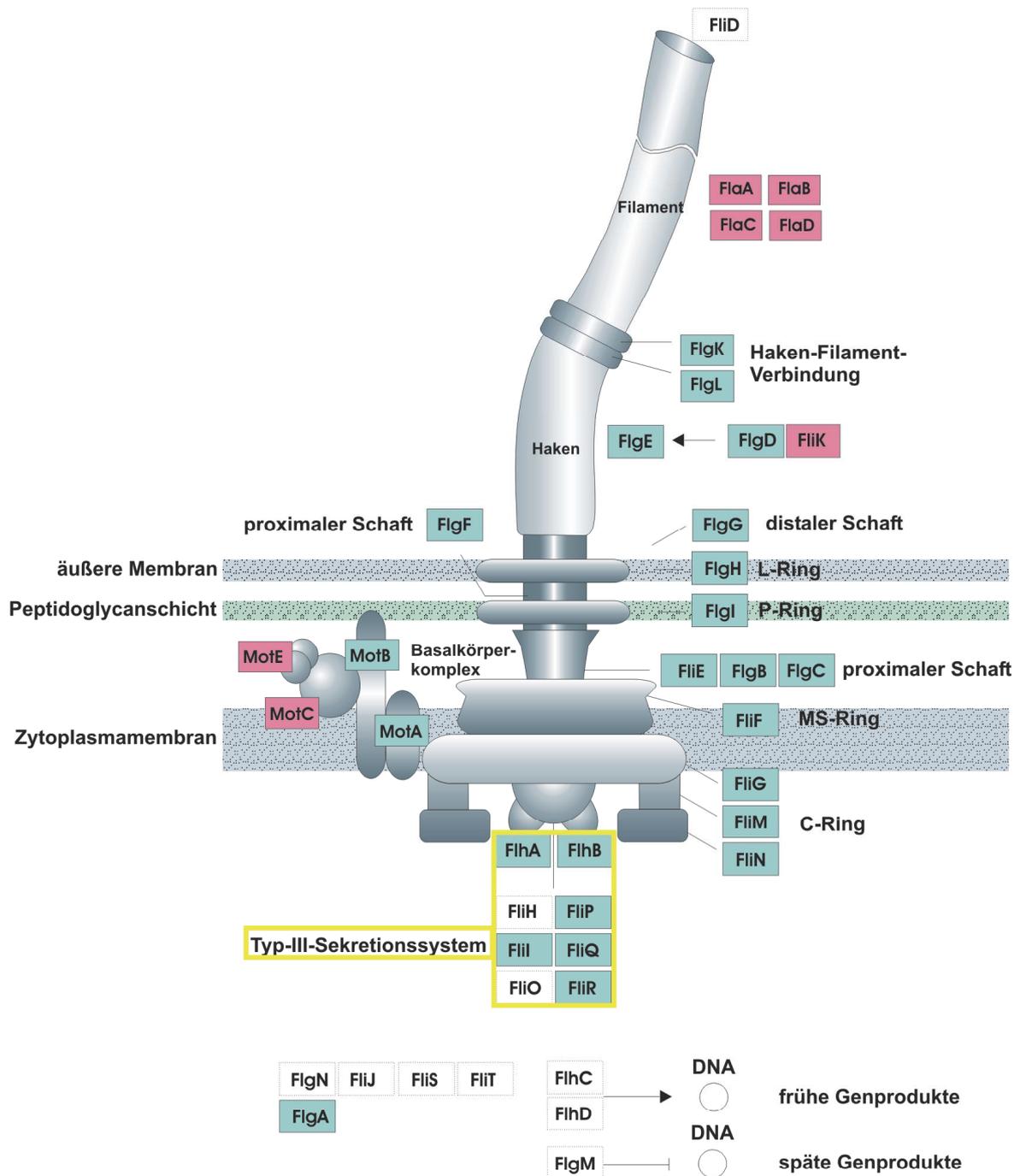
## A1. Vergleich der abgeleiteten Peptidsequenzen von *flhB* aus *S. enterica* serovar *typhimurium* und *S. meliloti*

		10	20	30	40	50	
<i>S. typhimurium</i>	-----MSSNK	TEKPTKKRLE	DSAKKQSFK	SKDLIIACLT	LGK---IAYL		42
<i>S. meliloti</i>	MAEEQDKDSK	TEAPSEKKIS	DATEKGNVFP	SREVTAFAST	LAIYIFVVEF		50
		60	70	80	90	100	
<i>S. typhimurium</i>	VSYGSENEFM	GIIKTIIIA-D	NFDQSMADYS	LAVFG----I	GLKYLIPEML		87
<i>S. meliloti</i>	ISDCAANMAE	ALKDITFEQPE	AWRLDTATDA	VALISHVVLK	CAALVLEVSI		100
		110	120	130	140	150	
<i>S. typhimurium</i>	LCLVCSALPA	LLQAGFVLAT	EALKPNLSAL	NPVEGAKKLF	SMRTVKRTVK		137
<i>S. meliloti</i>	LLILFGVGSS	IFQNLPRPVL	DRIQEKWNRV	SPAAGFKRIY	GVQGLVEFGK		150
		160	170	180	190	200	
<i>S. typhimurium</i>	TLLYSSSFVV	AAIICWKKYK	VEIFSQINGN	IVGTIAVIWRE	ILLALVITCL		187
<i>S. meliloti</i>	SIFKLIIVVSI	VVVLVLWNDY	FATLDMMFSD	PVTIIFTTMS	DLQQLIIVVL		200
		210	220	230	240	250	
<i>S. typhimurium</i>	ACALIVLLLD	AIAEYFLTMK	DMKMDKEVVK	REMKEQEGNP	EVKSRREVVH		237
<i>S. meliloti</i>	FATATLAIVD	LFWTRHHWYT	ELRMTREQEVK	DELKQSQGDP	IVKSRLRSMQ		250
		260	270	280	290	300	
<i>S. typhimurium</i>	MEILSEQVKS	DIENSRLTVA	NPTHITITGY	FKPELMPIMP	TSVYETNQRA		287
<i>S. meliloti</i>	RDRARKRMIS	SVPRATLILA	NPTHYAVALR	YVREESDAPV	VVAMGKDLVA		300
		310	320	330	340	350	
<i>S. typhimurium</i>	LAVRAYAEKV	GVPVIVDIKL	ARSLFKTHRR	YDLVSLEEID	EVLRLLVWLE		337
<i>S. meliloti</i>	LKTREIAEKN	GIPVFEDPPL	ARSMFAQVSV	DSVIPPVFKY	AVAELEIHRVY		350
		360					
<i>S. typhimurium</i>	EVENAGKDVI	QPQENEVRH					356
<i>S. meliloti</i>	AAQ-----	PQQRRT-					360

## A2. Vergleich der abgeleiteten Peptidsequenzen von *flIM* aus *S. meliloti* und *E. coli*

	10	20	30	40	50	
<i>E. coli</i>	MGDSILSQAE	IDALLNGDSE	VKDEPTASVS	GESDIRPYDP	NTQRRVVRER	50
<i>S. meliloti</i>	-----	-----	MSTS	TASNVHAFDR	RLIARMTGAL	24
	60	70	80	90	100	
<i>E. coli</i>	--LQALEIIN	ERFARHFRMG	LFNLLRRSP-	---DIITVGAI	RIQPYHEFAR	94
<i>S. meliloti</i>	GDDKVLGRTA	LELAQVFEDEL	LPGVLSQSETG	CDVTIAYAGF	RTGLRNDLIA	74
	110	120	130	140	150	
<i>E. coli</i>	NLPVPTNINL	IHLKPLRGTG	LVVFSPSLVF	IAVDNLFGGD	GRFPTKVEGR	144
<i>S. meliloti</i>	ALGDGVLIGD	FSLRNWCADF	QVGCDSPLVI	ALVEALLGAE	PTSIEEPAPR	124
	160	170	180	190	200	
<i>E. coli</i>	EFTHTEQRVI	NRMLKLALLEG	YSDAWKAINP	LEVEYVRSEM	QVKFTNITTS	194
<i>S. meliloti</i>	SLSKTEIDVA	LPVFHGIAEV	LRTAVNAPGG	FEPVVGRPYN	SAERAKPDPV	174
	210	220	230	240	250	
<i>E. coli</i>	PNDIVVN-TP	FHVEIGNLTG	EFNICTPFSM	TEPLRELLVN	PPLENSRNED	243
<i>S. meliloti</i>	LEDVFAASID	MTIGLGPVLS	TEFSVIVPOST	LLKTRIVSRK	GAGED-RNAK	223
	260	270	280	290	300	
<i>E. coli</i>	QNWRENLVRO	VOHSQLELVA	NFADISLRIS	QILKLNPGDV	LPPIEKPD--R	291
<i>S. meliloti</i>	TEWTEQLLEEQ	VRRSVAVALEA	RIRLESITLID	TLSRLQAGDV	LPFHGDQDVR	273
	310	320	330	340		
<i>E. coli</i>	IIAHVLCVFPV	LTSQYGTLLNG	OYATRIEHLI	NPILNSLNEE	QPK	334
<i>S. meliloti</i>	VEVSANCRDL	YVCEFGSRSGS	RYTVRVKDTHT	GSEQDILRHI	MS-	315

### A3. Übersichtsmodell des Flagellenmotors von *S. meliloti*



blau, in *S. meliloti* bekannte und identifizierte Genprodukte; weiß, in *S. meliloti* nicht identifizierte Genprodukte; rot, neuartige Komponenten, abweichend von enterobakteriellen System; gelb, Typ-III-Sekretionssystem.

## Veröffentlichungen

### Posterpräsentationen

E. Eggenhofer, M. Haslbeck & B. Scharf

MotE serves as a new chaperone specific for the periplasmic motility protein, MotC, in *Sinorhizobium meliloti*.

März 2004, VAAM-Jahrestagung, Braunschweig.

### Vorträge

E. Eggenhofer

MotE, a chaperone for the motor protein MotC in *Sinorhizobium meliloti*

März 2003, VAAM-Jahrestagung, Berlin.

### Publikationen

E. Eggenhofer, M. Haslbeck & B. Scharf (2004)

MotE serves as a new chaperone specific for the periplasmic motility protein, MotC, in *Sinorhizobium meliloti*.

Mol. Microbiol. 52(3), 701-12.

# Danksagung

Mein Dank gebührt an erster Stelle Herrn **Prof. Rüdiger Schmitt** für die Möglichkeit, die Dissertation an seinem Lehrstuhl anfertigen zu können, für die spannenden Diskussionen und nicht zuletzt für die Ratschläge und Anmerkungen während des Verfassens dieser Arbeit.

Ganz herzlich danken möchte ich **PD Dr. Birgit Scharf** für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung auch in weniger rosigen Zeiten. Außerdem danke ich ihr herzlich für die Möglichkeit auf den Tagungen in Berlin und Braunschweig Erfahrungen zu sammeln und für die Vermittlung des MPI-Aufenthaltes.

**PD Dr. Reinhard Rachel** danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Bildbearbeitung.

Ein ganz besonderer Dank gilt **Dr. Martin Haslbeck** (TU-München) für die hervorragende und unkomplizierte Zusammenarbeit.

**Dr. Johann Klare** (MPI-Dortmund) danke ich für die Zeit am Institut, für die gute Betreuung und die Einführung in die Welt der Kristallisation.

Bei meinen Laborkolleginnen und -kollegen **Andrea** und **Christine** (danke fürs Ausweinen auch bei privaten Problemchen), **Veronika**, **André**, **Eddy** (🤓, 😊), **Peter** (nand), **Moni**, **Verena**, und **allen Ehemaligen** für die schöne Zeit am Lehrstuhl und anderswo.

Ein ur-großes Dankeschön an **Klemens** für die schöne Zeit in 12.0 8, das Stickstoffeis, den Elfenbeinturm, das Wheaton, die McFlurrys... und fürs Dasein.

**Ulla** und **Reinhard** danke ich für die vielen Gespräche und das „Mut machen“.

Ganz besonders möchte ich **meinen Eltern**, **Großeltern**, sowie **Buzi** und **Andy** danken, die mich immer unterstützt haben und ohne deren Hilfe dieses Studium nicht möglich gewesen wäre.

Meinem **Steve** kann ich nicht genug dafür danken, daß er immer für mich da ist und mich auch in der schlimmsten Zeit unterstützt hat.

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbst verfaßt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

---

**Elke Eggenhofer**